

**MESSUNG VON INSELZELLOBERFLÄCHENANTIKÖRPERN
MIT HILFE EINES RADIOLIGANDENASSAYS**

JÖRG - MARTIN HEIM

1986

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. E. Buchborn

Messung von Inselzelloberflächenantikörpern
mit Hilfe eines Radioligandenassays

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Jörg-Martin Heim
aus
Nordhorn

1986

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Landgraf

Mitberichterstatter: Prof. Buchborn
Prof. Mehnert

Dekan: Prof. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.1986

Meinen Eltern

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

1. Einleitung.....	1
1.1 Autoimmunologische Phänomene beim Typ-1-Diabetes...	1
1.2 Humorale Reaktionen.....	2
1.2.1 ICA (Islet Cell Antibodies).....	2
1.2.2 CF-ICA (Complement-Fixing Islet Cell Antibodies).....	5
1.2.3 ICSEA (Islet Cell Surface Antibodies).....	6
1.3 Tiermodelle.....	8
1.3.1 Low-dose Streptozotocin.....	8
1.3.2 bb-Ratte.....	9
1.3.3 db/db-Maus.....	9
1.3.4 NOD-Maus.....	10
1.4 Immunintervention bei Typ-1-Diabetes.....	10
1.5 Humorale Immunität und Pankreastransplantation.....	11
1.4 Ziel der Arbeit.....	12
2. Methodik.....	13
2.1 Reagenzien.....	13
2.1.1. Puffer.....	13
2.1.1.1 Krebs-Henseleit-Puffer (KHH).....	13
2.1.1.2 Hanks-Puffer (HBSS).....	14
2.1.1.2.1 HBSS-Salzkonzentrationen.....	14
2.1.1.2.2 Hanks-Albumin-Puffer (HBSS-BSA).....	15
2.1.1.3 RPMI 1640.....	15
2.1.1.3.1 Herstellung des Grundmediums.....	15
2.1.1.3.2 RPMI-FKS.....	15
2.1.1.3.3 Zelldissoziationspuffer.....	15
2.1.1.4 Protein-A-Assay Puffer (HNB).....	16
2.1.1.4.1 Stammlösung.....	16
2.1.1.4.2 Fixierungspuffer (HNB-PFA).....	16
2.1.1.4.3 Konservierungspuffer (HNB-Na ₃).....	17
2.1.1.5 Sorin-Puffer.....	17
2.1.2 Dichtegradienten.....	17
2.1.2.1 Ficoll ^R -Hypaque.....	17
2.1.2.2 Ficoll ^R	18
2.1.2.3 Percoll ^R	18
2.1.2 Sonstige Reagenzien.....	18
2.1.3.1 Neutral ^R rot.....	18
2.1.3.2 Inactin ^R	18
2.1.3.3 DNase-Trypsin-Stammlösung.....	18
2.1.3.4 Zellzählungs-Lösungen.....	19
2.1.3.5 Salzsaurer Alkohol.....	19
2.1.3.6 Lösungen zur Proteinbestimmung.....	19
2.1.3.7 Fixierungslösung für Histologie.....	19
2.1.3.8 Blocklösung.....	20
2.2 Geräte.....	20
2.2.1 Perifusionssystem.....	20
2.2.1.1 8-fach Reservoir.....	20
2.2.1.3 Temperierblock.....	21
2.2.1.4 Förderpumpe.....	22
2.2.1.5 Fraktionensammler.....	22
2.2.2 Inkubation.....	23
2.2.3 Gallengangskatheter.....	24
2.2.4 Sonstige Geräte.....	24
2.2.5 Glaswaren.....	25
2.3 Tiere.....	25
2.4 Inselisolation.....	25
2.4.1 Pankreasentnahme.....	25
2.4.2 Vorbereitung des Inkubationsgemischs.....	26

2.4.3 Inkubation mit Kollagenase.....	27
2.4.4 Diskontinuierlicher Ficoll-Hypaque-Gradient.....	29
2.4.5 Mikroskopische Begutachtung.....	30
2.5 Inselzellpräparation.....	30
2.6 Zellfixierung.....	32
2.7. Inselzelloberflächenantikörperassay.....	32
2.8 Statische Inkubation isolierter Inseln.....	33
2.9 Perfusion isolierter Inseln.....	35
2.10 Insulinextraktion.....	38
2.11 Insulinbestimmung / Radioimmunoassay.....	38
2.12 Proteinbestimmung.....	39
3. Ergebnisse.....	40
3.1. Inselisolation.....	40
3.1.1 Inselanfärbung.....	41
3.1.1.1 Anfärbung mit Neutralrot intravenös.....	41
3.1.1.2 Anfärbung mit Neutralrot intraarteriell.....	41
3.1.1.3 Anfärbung durch Inkubation mit Neutralrot.....	42
3.1.1.4 Anfärbung über den Ductus pancreaticus.....	42
3.1.2 Dichtegradienten.....	43
3.1.2.1 Versuche mit Ficoll.....	43
3.1.2.2 Versuche mit Percoll.....	44
3.1.2.2.1 Erstellung einer Eichgeraden Dichte/Refraktionsindex.....	45
3.1.2.2.2 Bestimmung der Auftriebsdichte von Inseln....	45
3.1.2.2.3 Trennung im kontinuierlichen Percollgradienten.....	47
3.1.2.2.4 Trennung im diskontinuierlichen Percollgradienten.....	48
3.1.2.3 Versuche mit Ficoll-Hypaque.....	48
3.1.2.3.1 Zwei-Schichten-Gradienten.....	49
3.1.2.3.2 Drei-Schichten-Gradient.....	50
3.1.3 Biochemische und histologische Charakterisierung.	51
3.1.3.1 Immunhistologie.....	53
3.1.3.2 Insulin- und Proteingehalt.....	53
3.1.3.3 Statische Inkubation isolierter Inseln.....	53
3.1.3.4 Perfusion isolierter Inseln.....	55
3.2 Zelldissoziation.....	58
3.2.1 Mechanische Dissoziation.....	58
3.2.2 Zelldissoziation mit DNase.....	59
3.2.3 Zelldissoziation mit DNase und Trypsin.....	59
3.3 Inselzelloberflächenantikörperassay.....	62
3.3.1 Charakterisierung der Versuchsseren.....	62
3.3.2 Unspezifische Bindung von Immunglobulinen an Oberflächen.....	63
3.3.2.1 Einfluß von Albumin.....	63
3.3.2.2 Einfluß unterschiedlicher Reaktionsgefäße auf die Leerbindung.....	65
3.3.2.3. Zusammenhang zwischen unspezifischer Bindung und Serumproteinfraktionen.....	67
3.3.2.4 Zusammenhang zwischen unspezifischer Bindung und pH-Wert, Albumingehalt, Osmolarität und Temperatur der Blocklösung.....	68
3.3.3 Inkubationszeit mit Protein A-Tracer.....	70
3.3.4 Abhängigkeit der spezifischen Bindung von der Konservierungsdauer.....	70
3.3.5 Spezifität.....	72
3.3.5.1 Korrelation zwischen Zellzahl und Bindung.....	72

3.3.5.2 Abhängigkeit der Bindung von der Antikörpermenge.....	72
3.3.5.3 Bindung von Seren immunisierter Tiere.....	74
3.3.5.4 Adsorptionsversuche mit Inselzellen.....	75
3.3.6 Beeinflussung des Assays durch Pharmaka.....	77
3.3.7 Intra- und Interassayvariabilität.....	78
3.3.7.1 Intraassayvariabilität.....	78
3.3.7.2 Interassayvariabilität.....	79
3.3.7.2.1 Direktvergleich zweier Präparationen.....	79
3.3.7.2.2 Korrelation zwischen Verteilung der Inselzellarten	81
3.3.7.2.3 Bindung von Mischungen verschiedener Zellpräparationen.....	82
3.3.7.3 Standardisierung mit Hilfe von Referenzseren...	83
3.3.8 Normalbereich.....	85
3.4 Untersuchung von Patientenseren.....	85
3.4.1 Patientenkollektiv.....	85
3.4.2 Prävalenz.....	86
3.4.2.1 Prävalenz bezogen auf das Lebensalter.....	86
3.4.2.2 Prävalenz bezogen auf Diabetesdauer.....	86
3.4.3 Verhalten der ICSEA-Spiegel bei pankreas- transplantierten Patienten.....	88
3.4.4 Verhalten von ICSEA-Spiegeln unter immunsuppressiver Therapie des Typ-1-Diabetes....	89
3.4.5 Positive Ergebnisse ohne bestehenden Typ-1-Diabetes.....	90
4. Diskussion.....	92
4.1 Inselisolation.....	92
4.2 Zelldissoziation.....	93
4.3 Protein-A-Assay.....	94
4.4 Spezifität.....	95
4.5 Interassayvariabilität.....	96
4.6 Bestimmung von ICSEA in Patientenseren.....	97
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literaturverzeichnis.....	102

1. Einleitung

1.1 Autoimmunologische Phänomene beim Typ-1-Diabetes

In den letzten Jahren haben sich die Hinweise auf die autoimmunologische Pathogenese des insulinabhängigen Typ-1-Diabetes verstärkt (106).

Erste Verdachtsmomente ergaben sich durch histopathologische Untersuchungen an Patienten, die bei der Erstmanifestation im diabetischen Koma verstorben waren. In Pankreasschnitten dieser Patienten zeigte sich eine dichte lymphozytäre Infiltration der Langerhans'schen Inseln, die bei Typ-2-Diabetikern nicht beobachtet werden konnte (54).

Darüberhinaus wurde beim insulinabhängigen Diabetes eine Assoziation mit Histokompatibilitätsantigenen festgestellt, ähnlich der Häufung bestimmter HLA-Konstellationen bei anderen Autoimmunerkrankungen (157). Hierbei scheint der Kombination HLA-DR3 und/oder DR4 eine besondere Rolle zuzukommen, während DR2 äußerst selten beobachtet wird.

Die aus Zwillingsstudien festgestellte Konkordanz von nur 50 % bei eineiigen Zwillingen ließ jedoch auf eine zusätzliche exogene Noxe schließen. Eine bei Viruserkrankungen typische Häufung von Manifestationen im Frühjahr und Herbst wurde auch für den Diabetes beobachtet.

Durch epidemiologische Untersuchungen wurden verschiedene Viren für eine Häufung von neu aufgetretenen Diabetesfällen verantwortlich gemacht. In Verdacht stehen besonders Mumps (66, 67), Röteln (56), Coxsackie B4 und Cytomegalie (7). Darüberhinaus zeigten Reoviren und Encephalomyocarditis (EMC)-Viren in vitro cytopathische Effekte auf Betazellkulturen (178). Bevölkerungsstudien (7) konnten jedoch nur für Coxsackie B4 schlüssige Beweise, d. h. ein IgM-Anstieg mit konsekutiver Erstmanifestation, erbringen. Der direkte Beweis, d. h. der Nachweis von Virusmaterial in Betazellen gelang nur in Einzelfällen (178).

Als weitere exogene Noxe wurde das Rodentizid Vacor^R erkannt. Nach akzidentieller oder suizidaler Einnahme (Thailand, USA) entwickelt sich ein Diabetestyp, der viele pathologische und immunologische Gemeinsamkeiten mit einer Erstmanifestation besitzt (82).

Eine weithin akzeptierte Hypothese betrachtet daher den Typ-1-Diabetes als eine Autoimmunerkrankung, die bei genetischer Prädisposition durch exogene Faktoren ausgelöst werden kann. Unter dieser Hypothese wurden verschiedenste immunologische, sowohl humorale als auch zelluläre Parameter bei erstmanifesten Diabetikern untersucht.

Dabei konnte ein erhöhter Anteil aktivierter Lymphozyten bei Erstmanifestationen beobachtet werden, der für mehr als sechs Monate anhielt. Dieser war im Vergleich von Zwillingen auch beim nicht betroffenen Zwillingspartner feststellbar (1). Mori (132) konnte mit Hilfe des Leukozytenmigrationsinhibitionstests mit einem Betazellklon als Antigen eine Aktivierung von Lymphozyten feststellen, die länger als die humoralen Änderungen bestehen blieb. Die Untersuchungen der Lymphozytensubpopulation führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (105, 151, 68, 75). Charles et al. (27) konnten neben der von Complement abhängigen Antikörpern vermittelten Cytotoxizität auch antikörperabhängige zelluläre Cytotoxizität nachweisen.

1.2 Humorale Reaktionen

An inselzellspezifischen Antikörpern wurden beschrieben:

1. ICA = Islet Cell Antibodies
2. CF-ICA = Complement-Fixing Islet Cell Antibodies
3. ICSEA = Islet Cell Surface Antibodies

1.2.1 ICA (Islet Cell Antibodies)

Inselzellantikörper (ICA) wurden erstmals von Bottazzo et al. (16) und kurz darauf von MacCuish et al. (115) bei Patienten mit Polyendokrinopathie und gleichzeitig manifestem Diabetes beschrieben. Lendrum et al. (103) zeigten

als erste, daß ICA bei 60 - 70 % aller frisch erkrankten Diabetiker, jedoch nach einem halben Jahr nur noch bei 30 % der Patienten nachweisbar sind.

ICA werden im allgemeinen auf Gefrierschnitten von humanem Pankreas der Blutgruppe 0 mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz nachgewiesen (12); jedoch ist sowohl die Wahl des Antigens als auch die Art der Nachweisreaktion noch immer Gegenstand von Untersuchungen.

Da unfixiertes Pankreasgewebe starke Unterschiede in der Antigenität (123), sogar innerhalb eines Organs (90), zeigt, wurde von einigen Autoren die Verwendung von fixiertem Pankreasgewebe befürwortet (28, 37, 185), von anderen wegen der hohen Zahl falsch-positiver Befunde abgelehnt (33, 159). Kratsch et al. (91) untersuchten die Eignung von Pankreata verschiedener Spezies, Taub et al. (175) die Verwendung von Primatenpankreas.

Die geringe Empfindlichkeit der Originalmethode (16) war Anlaß für die Suche nach alternativen Verfahren zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörperreaktion. Von Cavender (26) wurde die Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörpers vorgeschlagen, während Krell (92) die Verwendung von Glukose-Oxidase und Taub (175) die von Avidin-Biotin-Peroxidase befürworteten. Die Autoren erreichten hierdurch eine höhere Sensitivität des Assays.

Der qualitative Charakter der Originalmethode führte zu dem Vorschlag mehrerer Autoren, die Menge der vorhandenen Antikörper in Form einer Endtiterbestimmung zu ermitteln (107, 106, 123). Ob die Versuche der Standardisierung entweder durch Workshopserien (17) oder durch monoklonale Antikörper als Referenzseren (186) zu einer Verbesserung der Aussagekraft beitragen, bleibt abzuwarten.

Inselzellantikörper gehören der IgG-Klasse an (13) und reagieren mit allen Inselzelltypen (15). Diese mangelnde Betazellspezifität führte zur Entwicklung von Verfahren, die durch Doppelfärbung die gleichzeitige Anfärbung von insulinenthaltenden Zellen ermöglichen (171, 120).

Über die chemische Struktur und Lokalisation des nachgewiesenen Antigens besteht keine Klarheit (106). Nayak et al. (137) stellten vor kurzem fest, daß es sich wahrscheinlich um ein Membranprotein, ein Sialoglucoconjugat, handelt. Andererseits gelang Sai der Nachweis von intrazellulären IgG-Antikörpern in Pankreasschnitten frisch verstorbener Patienten (162).

Ebenso besteht über die pathogenetische Bedeutung der ICA keine Einigkeit. Ein Teil der Autoren betont, daß ICA zusammen mit Complement zur Cytolyse fähig seien (102, 20). Hierzu stehen die Untersuchungen von Dobersen (39) in Widerspruch. Er zeigte, daß die cytotoxische Aktivität eines Serums auf dessen Gehalt an ICSA beruht, jedoch nicht auf dem Gehalt an ICA.

Der diagnostische Wert der ICA-Bestimmung ist auch nach zehn Jahren noch Gegenstand der Diskussion (106). Während die Prävalenz mit der Diabetesdauer korreliert (76) und die ICA häufig schon lange vor der Erstmanifestation des Diabetes vorhanden sind (60), scheint der Nachweis von ICA bei Verwandten 1. Grades keine prognostische Bedeutung zu haben (156). Hoskins et al. (71) konnten dies auch für eineiige Zwillinge zeigen.

Auch der prognostische Wert bei manifestem Diabetes ist umstritten. Howard et al. (72) konnten in Versuchen mit spontandiabetischen Affen eine positive Korrelation zur Stoffwechselsituation, gemessen anhand des Verhaltens der Blutzuckerspiegel während eines i. v. Glukosetoleranztestes, nachweisen. Dies konnte auch für Typ-1-Diabetiker gezeigt werden (122, 36). Es konnte jedoch keine Beziehung zwischen ICA und residualer C-Peptid-Exkretion oder dem Auftreten von Spätkomplikationen nachgewiesen werden (12).

1.2.2 CF-ICA (Complement-Fixing Islet Cell Antibodies)

Eine weitere Gruppe von inselzellspezifischen Antikörpern wurden von Soderstrum (169) und von Bottazzo (14) entdeckt. Zu deren Bestimmung werden 2 verschiedene Techniken verwendet:

1. indirekte Immunofluoreszenz (14): Pankreaskryostat-schnitte werden mit Patientenserum inkubiert, gewaschen und mit frischem Normalserum als Complementquelle überschichtet. Die Bindung von Complement wird mit einem fluorescein-markierten Antikörper gegen humanes C3 oder humanes C1q nachgewiesen.
2. Mikrocytotoxizitätsassay: frisch isolierte Inselzellen (169) oder Zellen eines Betazellklons (39) werden nach Wigzell (183) mit ^{51}Cr markiert, mit Patientenserum und einer Complementquelle inkubiert und die durch Cyto-lyse austretende Radioaktivität wird gemessen.

CF-ICA gehören sowohl der IgG- als auch der IgM-Klasse an (107). Übereinstimmend wird von einer Prävalenz von 50 - 60 % bei Erstmanifestationen berichtet (12, 69, 8, 151, 158).

Die prospektive Bedeutung von CF-ICA-Titern bei nicht Erkrankten scheint größer zu sein als die der ICA (130, 9) und sie treten in Gegensatz zu diesen nicht bei Patienten mit Polyendokrinopathie auf (50). Das Auftreten von CF-ICA ist von der verbliebenen Betazellmenge abhängig (134, 135, 170) und geht daher dem C-Peptid-Verlust voraus (135). Die Prävalenz der CF-ICA fällt nach der Manifestation des Diabetes doppelt so schnell wie die der ICA (14). Ob sie eine Untergruppe der ICA darstellen (20), erscheint fraglich (39).

Die funktionelle Wertigkeit konnte in vitro mit einigen CF-ICA-positiven Seren gezeigt werden. Sai et al. (163) wiesen eine Hemmung der Insulinsekretion isolierter Inseln durch CF-ICA nach.

Eine zusätzliche Bedeutung scheint die Bestimmung der CF-ICA bei der Erkennung der Pseudo-Typ-2-Diabetiker zu haben (57).

Mittlerweile konnte ein monoklonaler Antikörper mit CF-ICA-Eigenschaften hergestellt werden (51).

1.2.3 ICSA (Islet Cell Surface Antibodies)

Inselzelloberflächenantikörper (ICSA), d. h. Antikörper, die an der Oberfläche lebender, intakter Inselzellen binden, wurden erstmals von MacLaren et al. (117) in Seren diabetischer Patienten beobachtet. Hierzu wurden Zellen eines kultivierbaren humanen Insulinoms verwendet.

ICSA gehören der IgG-Klasse an (69) und sind zusammen mit Complement cytotoxisch für Betazellen (39, 78, 80, 81, 126).

Diese Bindung konnte auch an frisch isolierten Ratteninseln nachgewiesen werden (109). Wegen der methodischen Schwierigkeiten bei der Gewinnung des Antigens werden verschiedene Ausgangsmaterialien benützt: isolierte Ratten- (109) oder Mäuseinseln (41), Zellen eines Ratteninselnklons (46, 38), humanfetale Inselzellen (150) oder Zellen eines humanen Insulinomklons (128, 129). Der Nachweis der Bindung von Antikörpern an die Inselzelloberfläche erfolgt mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz (109), zusammen mit einem fluoreszenzaktiviertem Zellsorter (174), mit zusätzlicher Anfärbung der Betazellen (150, 180), unter Verwendung eines Protein-A-Radioligandenassays (111, 43), durch einen Microcytotoxizitätsassay (39, 65) oder mit Hilfe einer ELISA-Methode.

Die funktionelle Bedeutung konnte sowohl in vivo als auch in vitro festgestellt werden. Kanatsuna et al. (80, 81) konnten nachweisen, daß Seren frisch manifester Diabetiker die glucoseinduzierte Insulinsekretion perifundierter Inselzellen behindern. Dieser Effekt konnte auch an isolierten Pankreata von Mäusen, denen Immunoglobulinpräparationen aus ICSA-positiven Seren verabreicht worden waren, gezeigt wer-

den (106). Hingegen fanden Ziegler et al. einen stimulierenden Effekt von IgG- Präparationen aus ICSA-positiven Seren auf die Insulinsekretion (189). Kitagawa et al. (86) konnten dies bestätigen, stellten jedoch Unterschiede zwischen diabetischen Seren und Seren von Patienten mit Polyendokrinopathie fest (87).

Untersuchungen von Nakamura und Mitarbeitern (136) konnten jedoch keinen Effekt von ICSA, die in Hasen induziert wurden, nachweisen. Hierfür sind zwei Gründe denkbar: 1. könnte durch die Immunisierung mit Hilfe von Freund'schem Adjuvans primär ICA induziert worden sein und 2. ist durch die intraperitoneale Verabreichung der gewonnenen ICSA nicht sichergestellt, daß sie systemisch wirksam werden.

Im Vergleich zu den ICA liegen über das Antigen, an das ICSA binden, präzisere Erkenntnisse vor. Baekkeskov et al. konnten mit ICSA-positiven Seren sowohl aus Ratteninselzellen (4) als auch aus Humaninselzellen (6) ein 64 kD-Membranprotein immunpräzipitieren. Ein interessanter Befund war dabei die Tatsache, daß aus Inseln eines anderen Spenders mit HLA DR3, d. h. einem Histokompatibilitätsantigen, welches bei Diabetikern gehäuft auftritt (157), ein anderes Antigen mit dem Molekulargewicht 38 kD isoliert werden konnte.

Hingegen präzipitierten Seren von Hasen, die gegen intakte Ratteninselzellen immunisiert worden waren, ein 40 k-Protein, welches nur auf Inselzellen, nicht jedoch auf Lymphozyten nachweisbar war (5, 41). Nach Adsorption der Seren sowohl mit Inselzellen als auch mit Lymphozyten, verminderte sich die Bindung an Inselzellen. Hieraus wurde der Schluß gezogen, daß sowohl Antikörper gegen Inselzellen als auch gegen Lymphozyten induziert worden waren.

Colman et al. (29) konnten nachweisen, daß das 64 kD-Protein ein Einzelpeptid mit Disulfidbrücken, die für die Konformation wichtig sind, darstellt, welches nicht speziesspezifisch und nur in geringer Menge auf der Inselzelloberfläche vorhanden ist. Die Vermutung, daß es sich bei dem Antigen um Tubulin, ein cytoplasmatisches Protein, handelt, konnte

um Tubulin, ein cytoplasmatisches Protein, handelt, konnte von Rousset et al. (161) widerlegt werden.

Vialettes et al. (181) fanden eine statistisch signifikante Korrelation für das Auftreten von ICSA, CF-ICA und ICA bei frisch manifesten Typ-1-Diabetikern. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Hauptmenge der ICSA, die im Serum frisch erkrankter Diabetiker vorhanden ist, an Betazellen bindet, während ICSA aus Seren von Patienten mit längerer Diabetesdauer sowohl an A- als auch an PP-Zellen binden (180).

1. 3 Tiermodelle

Für das Studium der autoimmunologischen Vorgänge bei der Manifestation des Typ-1-Diabetes stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung. Es sind dies u. a.

1. "low-dose Streptozotocin"
2. bb-Ratte
3. db/db-Maus
4. NOD-(non obese diabetic) Maus

1.3.1 Low-dose Streptozotocin

Während Streptozotocin bei hoher Dosierung schon nach einmaliger Gabe als Betazellgift einen Diabetes auslöst, führt es nach mehrmaliger Gabe in geringer Dosierung zu einem Diabetes mit vielen autoimmunologischen Phänomenen.

So konnten Itoh et al. (77) eine verminderte Stimulierbarkeit von Lymphozyten und ein Auftreten von ICSA bei Mäusen nach Gabe von Streptozotocin (40 mg/kg Körpergewicht für 5 Tage intraperitoneal) zeigen. Ebenso gelang der Nachweis von complement-fixierenden Antikörpern (119). Kim und Steinberg (85) konnten mit T-Zellen von streptozotocindiatetischen Mäusen die Erkrankung auf andere Mäuse übertragen, jedoch nur nachdem diese mit einer subdiabetogenen Einzeldosis Streptozotocin behandelt worden waren. Sie kamen daher zu dem Schluß, daß eine Alteration der Betazelle

durch Streptozotocin notwendig ist, um die T-Zell-abhängige Insulitis auszulösen.

1.3.2 bb-Ratte

Eines der am besten untersuchten Tiermodelle dürfte die bb-Ratte sein, eine Spontanmutation der Wistar-Furth-Ratte. Bei Stämmen mit hoher Diabetesinzidenz werden zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife 40 - 90 % der Tiere diabetisch. Während Antikörper gegen verschiedene andere Körpergewebe schon von Geburt an vorhanden sind (11,48), treten ICSA sowie Antikörper gegen Lymphozyten erst vor der Manifestation des Diabetes auf (47, 48, 49, 147), ebenso CF-ICA (125). Außerdem kann eine konstante Lymphopenie beobachtet werden (42, 45), ohne daß zu diesem Zeitpunkt schon morphologische Veränderungen im Sinne einer Insulitis vorhanden sind.

MacKay und Mitarbeiter (118) konnten mit T-Lymphozyten erkrankter Tiere den Diabetes auf andere Stämme übertragen, Prud'homme et al. (149) gelang es, T-Lymphocyten zu isolieren, die spezifisch mit Inselzellen reagierten. Es war ebenso möglich, mit Hilfe von Lymphozyten von der bb-Ratte, einen monoklonalen Antikörper mit ICSA-Eigenschaften herzustellen (18, 148). Auch konnte an der bb-Ratte die Beziehung diabetogener Gene zu Histokompatibilitätsantigenen untersucht werden (25).

1.3.3 db/db-Maus

Die db/db-Maus, eine Mutation des C57BL/KsJ-Stammes, stellt ein weiteres Tiermodell des autoimmunologisch bedingten Diabetes mellitus dar. Hier stehen vor allem zelluläre Mechanismen im Vordergrund, u. a. auf dem T-Zell-Niveau, aber auch humorale Mechanismen, wie complementabhängige und antikörperabhängige Zytotoxizität ließen sich nachweisen (34).

1.3.4 NOD-Maus

Ein relativ neues Tiermodell stellt die NOD- (non obese diabetic) Maus dar (83). Während bei diesen Tieren die unspezifische zelluläre Immunität vermindert ist, konnten gegen Inselzellantigen sensibilisierte Lymphozyten nachgewiesen werden (127). Ebenso ließen sich ICSEA, die zusammen mit Complement zytolytische Aktivität besaßen, zeigen (127, 187).

1.4 Immunintervention bei Typ-1-Diabetes

In Hinblick auf die autoimmunologischen Komponenten bei der Pathogenese des Typ-1-Diabetes wurden Versuche unternommen, in dieses Geschehen einzugreifen, um den irreversiblen Betazellverlust zu verhindern.

Im bb-Rattenmodell konnte durch Antilymphozytenseren, Ganzkörperbestrahlung, neonatale Thymektomie und Vollbluttransfusion die Diabetesinzidenz gesenkt werden (154). Hingegen zeigte Cortison in niedriger Dosierung keinen Effekt (45, 44).

Beim humanen Typ-1-Diabetes wurden ebenfalls verschiedene Formen der Immuntherapie erprobt (106). Angewandt wurden z. B. Plasmapherese (152), Interferon (89), Steroide, Inosiplex und Methisoprinol (106).

Abgesehen von der Tatsache, daß es sich bei diesen Untersuchungen nicht um kontrollierte Studien handelte, konnte mit keiner Therapie ein überzeugender Beweis der Wirksamkeit erbracht werden.

Als neuestes Immunsuppressivum wurde Cyclosporin A angewandt, womit bessere Erfolge erzielt werden konnten. Cyclosporin A ist ein potenter Hemmer der T-Helferzellen, wahrscheinlich durch Inhibition der Lymphokininproduktion (121), und kann bei der bb-Ratte die Diabetesinzidenz signifikant vermindern (121, 154, 106). Stiller et al. zeigten in einer größeren offenen Studie, daß durch Cyclosporin-A-

Therapie die Remissionsrate bei frisch manifestem Diabetes erhöht werden kann, jedoch nur, wenn die Therapie innerhalb von 6 Wochen nach Diagnosestellung begonnen wird. Nach dem Absetzen des Cyclosporin A kam es bei der Mehrzahl der behandelten Patienten zu einem Wiederauftreten der Diabetes (172, 173, 121).

Obwohl Cyclosporin A im Vergleich zu anderen Immunsuppressiva vergleichsweise geringe Nebenwirkungen besitzt (Hepatotoxizität und höhere Inzidenz von Malignomen bei großen Dosen), bedingt die selbst bei therapeutischen Spiegeln beobachtete Nephrotoxizität eine sorgfältige Auswahl der Patienten (106). Diese Auswahl kann vielleicht aufgrund der An- oder Abwesenheit der bei Typ-1-Diabetikern beobachteten inselzellspezifischen Antikörper getroffen werden. Die Hoffnung, durch Bestimmung der ICA die Patientenauswahl zu erleichtern und den Therapieerfolg vorherzusagen, erfüllte sich jedoch nicht. In der Studie von Mandrup-Poulsen et al. (121) kommt zum Ausdruck, daß zwar die ICA-Spiegel in der mit CyA behandelten Gruppe schneller fielen, jedoch konnte keine Beziehung, weder zeitlich noch quantitativ, zur verbliebenen oder wiederkehrenden Betazellfunktion festgestellt werden. Die Autoren raten deshalb entschieden davon ab, die Bestimmung der ICA als Auswahlkriterium für die Zielgruppe zu verwenden und stellen die pathogenetische Bedeutung der ICA erneut zur Diskussion.

1.5 Humorale Immunität und Pankreastransplantation

Eine Möglichkeit der Behandlung des Diabetes, u. a. bei bestehenden schweren Spätkomplikationen, ist die Transplantation von Pankreas oder isolierten Inseln.

Nun ist es unter der Hypothese der Autoimmunpathogenese vorstellbar, daß sich die inselzellspezifischen Antikörper auch gegen das transplantierte Organ richten, zumal diese Antikörper in ca. 10 % der Patienten auch lange nach der Erstmanifestation des Diabetes nachweisbar sein können (76). Diese Vermutung wird durch Beobachtungen bestärkt, die bei Transplantationen zwischen nicht immunsuppressiv behandelten, eineigen Zwillingen gemacht wurden. Hierbei

kam es zum Verlust des Transplantats mit den histologischen Zeichen einer Insulitis (106).

Auch konnte im Tierversuch eine Beziehung zwischen dem Auftreten von ICSEA und Abstoßung des transplantierten Inselgewebes hergestellt werden (188).

Die Frage der Inselzellspezifischen Abstoßung unter Immunsuppression bei Humanpankreastransplantationen ist offen. Während Secchi et al. (167) keine Beziehung zwischen Auftreten von ICA und Organabstoßung fanden, stellten Gunnarson (61) ICSEA bei der Abstoßung von transplantierten fetalem Inselgewebe fest.

1.4 Ziel der Arbeit

Es sollte die Frage untersucht werden, wie sich Inselzellenoberflächenspezifische Antikörper

1. unter immunsuppressiver Therapie des Typ-1-Diabetes
2. im Verlauf einer Abstoßungsreaktion nach Pankreastransplantation

verhalten.

Hierzu sollte ein Radioligandenassay (43) verwendet werden, der die Antigene auf isolierte Ratteninseln benutzt. Daher war die Entwicklung eines Inselisoliationsverfahrens notwendig, das mit vertretbarem Zeitaufwand zu einer ausreichenden Ausbeute führt. Weiterhin sollte die optimale Methode zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus diesen isolierten Inseln gefunden werden.

Der Radioligandenassay war auf seine Spezifität und Reproduzierbarkeit zu prüfen.

2. Methodik

2.1 Reagenzien

Alle Reagenzien waren, soweit nicht anders vermerkt, pro analysii.

2.1.1. Puffer

Die Salze stammten von E. Merck, Darmstadt; Phenolrot von Fluka; HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure) als freie Säure von Sigma (Kat. Nr. #3375).

2.1.1.1 Krebs-Henseleit-Puffer (KHH)

Der für die Perifusions- (siehe 2.9) und Inkubationsexperimente (siehe 2.8) verwendete Puffer war ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer.

	mM	g/l
NaCl	120,0	7,0130
KCl	4,7	0,3504
KH_2PO_4	1,2	0,1633
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2	0,2958
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,5	0,3676
NaHCO_3	15,0	1,2602
Hepes	10,0	2,3830
BSA (Sigma #7888 'RIAGrade')		1

Glukose: wie bei den Versuchen angegeben.

Der Puffer wurde vor Verwendung mit Hilfe eines 0,22 μm -Filters sterilfiltriert, mit 95 % O_2 / 5 % CO_2 äquilibriert und mit einnormaler HCl bzw. NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

2.1.1.2 Hanks-Puffer (HBSS)

Zur Inselisolation (siehe 2.4) wurde ein modifizierter Hanks-Puffer verwendet.

2.1.1.2.1 HBSS-Salzkonzentrationen

	mM	g/l
NaCl	137,0	8,0
KCl	5,4	0,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,407	0,1
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,26	0,1845
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,425	0,152
KH_2PO_4	0,442	0,06
Glukose $\cdot \text{H}_2\text{O}$	5,05	1
Phenolrot		0,02
NaHCO_3	3,6	0,3
Hepes	25	5,958

Der Puffer wurde auf pH 7,4 eingestellt.

2.1.1.2.2 Hanks-Albumin-Puffer (HBSS-BSA)

Die Salzkonzentrationen waren wie bei 2.1.1.2.1, zusätzlich jedoch 1g/l Rinderserumalbumin (Sigma #A9647, "essentially free acid free")

2.1.1.3 RPMI 1640

2.1.1.3.1 Herstellung des Grundmediums

Pulver für 1 l Medium (Serva #47885), 4,766g HEPES (entspricht einer Konzentration von 20 mM), 300 mg/l L-Glutamin und 350 mg/l NaHCO_3 wurden unter Rühren in Aqua bidest gelöst. Hierzu werden 10 ml Antibiotikastammlösung (Serva #47970) gegeben. Dies ergibt eine Endkonzentration von 100 IU/ml Penicillin G sowie 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin.

2.1.1.3.2 RPMI-FKS

Fetales Kälberserum (FKS, Serva #47900) wurde 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert. 9 Teile RPMI 1640 und 1 Teil hitzeinaktiviertes FKS wurden gemischt, die Mischung mit Carbogen äquilibriert und der pH auf 7,4 eingestellt.

Diese Lösung wurde in 20 ml-Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor dem Versuch wurde die aufgetaute Lösung erneut mit Carbogen äquilibriert, da sowohl O_2 wie auch CO_2 beim Einfrieren entweicht.

2.1.1.3.3 Zelldissoziationspuffer

EGTA (1,2-Di(2-aminoethoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraaceticacid) war von Sigma (Kat. Nr. E4378)

In 100 ml RPMI-Grundlösung wurden 76,1 mg (entsprechend einer Konzentration von 2 mM) EGTA sowie 1g Rinderserumalbumin (Sigma #A9647) eingerührt und in 2,2 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

Vor dem Versuch wurde die aufgetaute Lösung mit Carbogen äquilibriert und der pH-Wert kontrolliert.

2.1.1.4 Protein-A-Assay Puffer (HNB)

Für den Protein-A-Assay wurde ein HEPES-NaCl-BSA-Puffer verwendet.

2.1.1.4.1 Stammlösung

Die 10-fache konzentrierte Stammlösung enthielt:

	mM	g/l
NaCl	1400	81,76
HEPES	100	23,83
Rinderserumalbumin (SIGMA #9647)		100,00

Die Stammlösung wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert, zum Assay aufgetaut, 1:10 mit Aqua bidest verdünnt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

2.1.1.4.2 Fixierungspuffer(HNB-PFA)

1 g Paraformaldehyd (E. Merck) wurde in ca. 20 ml Aqua bidest bei 60 - 65 °C und pH 9 - 10 unter Rühren gelöst.

Sobald die Lösung völlig klar war, wurde sie auf 4 °C abgekühlt und der pH-Wert in den neutralen Bereich gebracht.

Sodann wurden 2,5 ml HNB-Stammlösung zugegeben, das Volumen auf 25 ml gebracht und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, so daß sich folgende Endkonzentrationen ergaben:

NaCl	140 mM
HEPES	10 mM
BSA	1 g/100 ml
PFA	4 g/100 ml

Mit diesem Puffer wurden die frisch isolierten Inselzellen fixiert.

2.1.1.4.3 Konservierungspuffer (HNB-Na₃N)

Die Konservierung der Inselzellen (siehe 2.6) erfolgte mit einem HNB-Puffer, der zusätzlich 15 mM Na₃N enthielt.

Zur Herstellung von 100 ml wurden 10 ml HNB-Stammlösung, 90 ml Aqua bidest und 97,5 mg Na₃N gemischt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

2.1.1.5 Sorin-Puffer

Zur Verdünnung des Tracers im Insulin-Radioimmunoassay (siehe 2.11) wurde ein Sorinpuffer folgender Zusammensetzung verwendet:

10,6 g/l Na₂HPO₄ · H₂O
3,725 g Titriplex III (E. Merck)
1,0 g Rinderserumalbumin (Behring)
2,0 g Humanalbumin reinst (Behring)

Der pH-Wert wurde wieder auf 7,4 eingestellt.

2.1.2 Dichtegradienten

2.1.2.1 Ficoll-Hypaque

Die gebrauchsfähige wässrige Lösung aus Ficoll (einem Saccharosepolymer mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 40.000) und Hypaque (einem trijodierten Kontrastmittel) wurde in den Dichten 1,077 g/ml, 1,083 g/ml und 1,090 g/ml von der Klinikapotheke geliefert.

2.1.2.2 Ficoll^R

Zur Herstellung einer 22,8 %igen (w/w) Stammlösung wurden 22,8 g Ficoll 400 (Pharmacia) in 77,2 g HBSS bei 4 °C über Nacht unter Rühren gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden durch Verdünnung mit HBSS Ficollkonzentrationen von 21.1 %, 19.84 % und 10.61 % hergestellt.

2.1.2.3 Percoll^R

Zur Herstellung einer isoosmotischen Stammlösung wurden 9 Teile Percoll (Pharmacia) und 1 Teil 10-fach konzentrierter Salzlösung (NaCl oder HBSS) gemischt.

2.1.2 Sonstige Reagenzien

2.1.3.1 Neutralrot

300 mg Neutralrot (Serva #30305) wurden in 100 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst und vor dem Versuch im Verhältnis 1:5 mit HBSS weiterverdünnt.

2.1.3.2 Inactin^R

0,5 g Inactin (Byk Gulden) wurden in 6,25 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst (ergibt eine Konzentration von 80 mg/ml).

2.1.3.3 DNase-Trypsin-Stammlösung

Es wurden 2 mg DNase I (Worthington #L50002139) in 10 ml Aqua bidest gelöst. Dies ergibt eine DNase-Stammlösung von 200 µg/ml. 5 Teile DNase-Stammlösung wurden mit 2 Teilen 2,5 % - Trypsinlösung (Flow #16-893-49) und 3 Teilen Aqua bidest gemischt, diese Mischung in 100 µl Aliquots bei -20 °C gelagert und beim Versuch mit Zelldissoziationspuffer (siehe 2.1.1.3.3) 1:50 weiterverdünnt. Dadurch ergeben sich die Endkonzentrationen von:

100 µg/ml Trypsin

2 µg/ml DNase I

2.1.3.4 Zellzählungs-Lösungen

1 mg Acridinorange (Sigma #A6014) bzw. 20 mg Ethidiumbromid (Sigma #8751) werden in je 100 ml Dulbecco's PBS (NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; Na_2HPO_4 1,15 g/l; KH_2PO_4 0,2 g/l; CaCl_2 0,1 g/l; MgCl_2 0,1 g/l) gelöst, steriltfiltriert und bei 4 °C in dunklen Flaschen aufbewahrt.

Zum Versuch wurden aus 1 Teil Acridinorange-Stammlösung, 1 Teil Ethidiumbromid-Stammlösung und 18 Teilen Kulturmedium die Arbeitslösung hergestellt. Diese wurde dann im Verhältnis 1 : 1 mit der betreffenden Zellsuspension gemischt.

2.1.3.5 Salzsaurer Alkohol

Zur Insulinextraktion (siehe 2.10) wurde salzsaurer Alkohol (15 ml 12 normale HCl in 1 l 70 % Äthanol) verwendet.

2.1.3.6 Lösungen zur Proteinbestimmung

1 Teil Kaliumtartratlösung (8 mg/ml), 1 Teil $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung (4 mg/ml) und 2 Teile Natriumcarbonatlösung (200 mg/ml) werden unter Rühren gemischt. Dies ergibt die sog. CTC-Lösung (Copper-tartrat-carbonat).

Reagens A wurde durch Mischen von 1 Teil CTC, 1 Teil Natriumdodecylsulfatlösung (100 mg/ml), 1 Teil Natronlauge (0,8 N) und 1 Teil Aqua bidest hergestellt. Reagens B bestand aus einer 1 : 5 Verdünnung von Folin-Ciocalteu (Merck) mit Aqua bidest.

2.1.3.7 Fixierungslösung für Histologie

Zur Herstellung von histologischen Präparaten wurde eine Bouin'sche Lösung nach (24) verwendet, bestehend aus 15 Teilen gesättigter Pikrinsäurelösung, 5 Teilen Formaldehyd für die Histologie und 1 Teil Eisessig. Diese Lösung wurde vor Gebrauch jeweils frisch angesetzt.

2.1.3.8 Blocklösung

Zur Verhinderung der unspezifischen Absorption von Antikörpern an Plastikoberflächen wurden diese 1 Stunde bei 25 °C mit einer 20 mM HEPES-Lösung, die zusätzlich 6g/100ml Rinderserumalbumin (Serva #9647) enthielt, inkubiert.

2.2 Geräte

2.2.1 Perifusionssystem

Zur Bestimmung der funktionellen Integrität der isolierten Inseln wurde das erstmals von Lacy (96) publizierte Perifusionsprinzip verwendet. Die hier beschriebene Apparatur ist eine Modifikation nach Kikushi (84) und Panten (140).

Diese bestand aus:

1. 8-fach Reservoir
2. 4-fach Dreiwege-Ventil
3. Temperierblock
4. Förderpumpe
5. Fraktionensammler

2.2.1.1 8-fach Reservoir

Dieses bestand aus einem Acrylglaskasten (Abb. 1) mit den Maßen 37 x 19 x 10 cm. In ihm waren 8 Acrylglasrohre (Innendurchmesser 6,4 cm, Höhe 7 cm) wasserdicht eingelassen. Der Auslaß erfolgte an der Unterseite über einen männlichen Lueranschluß. Die Temperierung wurde über großkalibrige Zu- und Abflußanschlüsse an den beiden Schmalseiten vorgenommen. Die Gaszufuhr (95 % O₂ / 5 % CO₂) erfolgte über den Acrylglasdeckel, für jedes Reservoir getrennt geregelt.

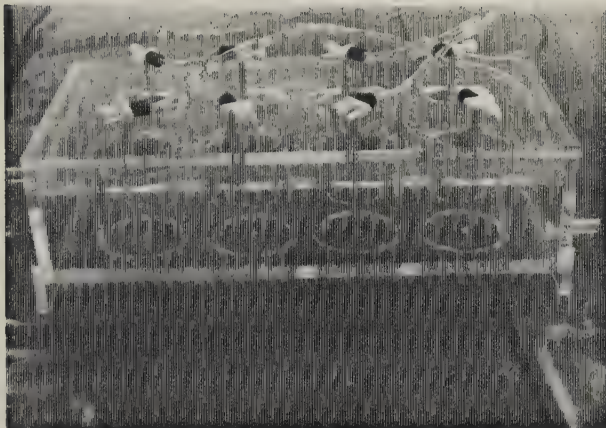


Abb. 1: 8fach-Reservoir für die Perifusion isolierter Inseln

2.2.1.2 4-fach Dreizehventil

Es wurden Schiebeventile der Firma Ismatec benutzt, wobei 4 Stück mechanisch gekoppelt waren. Diese Ventile gestatten ein schnelles, synchrones und druckschwankungsarmes Umschalten und weisen einen geringen Totraum auf (184).

2.2.1.3 Temperierblock

Der Temperierblock (Abb. 2) setzte sich aus zwei Acrylglasblöcken (10 x 3 x 6 cm) zusammen, die durch zwei M5-Nylongewindestangen fest miteinander verschraubt wurden. Die Temperierung erfolgte über je zwei querangeordnete Temperierkanäle (20 mm Durchmesser) und wurde mit Hilfe eines "Sekundenfühlers" kontrolliert, der über Meßöffnungen bis an die Reaktionskammern herangeführt werden konnte. Vier senkrecht angeordnete Kanäle (2 mm Durchmesser), die über männliche Lueradapter mit dem System verbunden waren, dienten zur Zu- und Abfuhr der Pufferlösungen. Die Reaktionskammern wurden aus 2 aufeinanderstehenden, kegelförmigen Hohlräumen (Grunddurchmesser 10 mm, Öffnungswinkel 130 Grad) gebildet. In die untere Hälfte war eine Siebstütz-

platte (Milipore # xx 2702510) eingelassen, die zur Unterstützung des Filters (Milipore #SMWP 01300, 5 μ m Porenweite, Material: gemischte Zelluloseester) diene. Die Abdichtung der Kanäle erfolgte über je zwei Silikondichtungen (Milipore # Sx0002501).

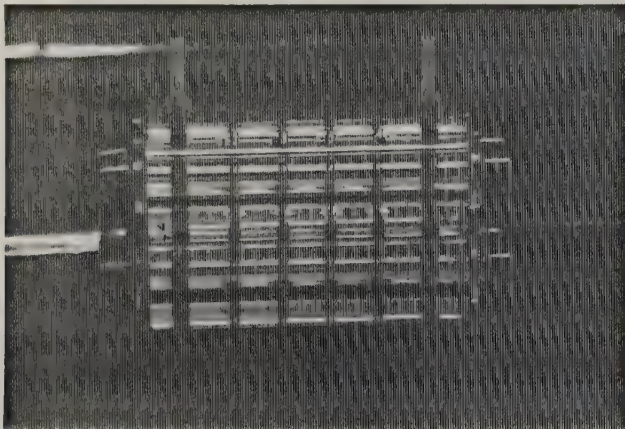


Abb. 2: Temperierblock für die Perifusion isolierter Inseln

2.2.1.4 Förderpumpe

Als Förderpumpe diente eine Pumpe der Firma Ismatec (#MPJ-4), als Förderschläuche der Typ "0,6 ml/min" der Firma SMA. Diese Kombination ergab ein Fördervolumen von 0,5 ml/min bei Schalterstellung 4.

2.2.1.5 Fraktionensammler

Als Fraktionensammler wurde ein Linear II der Firma Serva benutzt, die Zeitsteuerung erfolgte über einen Taschencomputer (PC 1500 der Fa. Sharp) mit entsprechendem Programm.

2.2.2 Inkubation

Zur Inkubation von Inseln diente ein System modifiziert nach Gerner (55).

Dieses setzte sich aus einem Temperiergefäß (9 x 9 x 14 cm), das auf einem Magnetrührer plaziert war, einem Reagenzglashalter mit 6 St. Polystyrolröhrchen (Fa. Greiner #160101, 16 x 100 mm) und Filterhaltern (hergestellt aus 5 ml Polystyrolröhrchen und entsprechenden Stopfen) zusammen. Als Filtermaterial wurde ein Nylogewebe mit 30 μm Porenweite (Fa. Reichelt, #948441) verwendet. Die Pufferdurchmischung wurde durch Magnetrührstäbchen von 4 mm Länge erreicht (siehe Abb. 3).

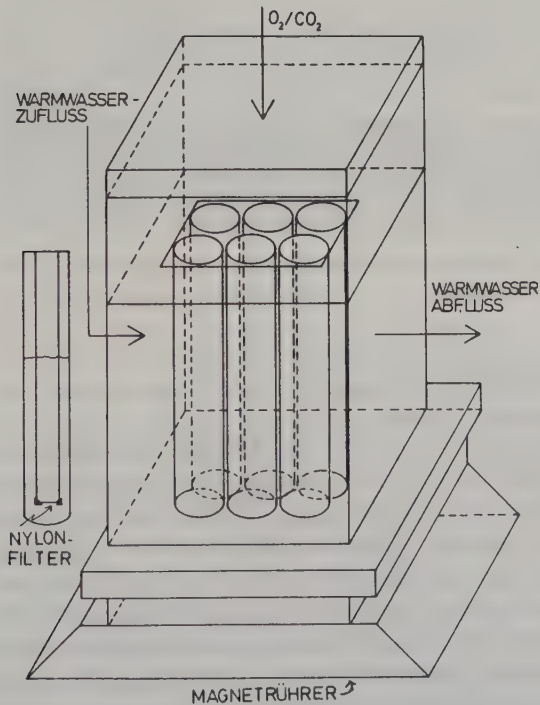


Abb. 3: Inkubationssystem schematisch

2.2.3 Gallengangskatheter

Zur Gallengangskatheterisierung diente ein Katheter, der aus einem Polypropylenschlauch (Portex PP50, äußerer Durchmesser 1 mm) und einer Luer-Nadel (17 gauge) bestand (Abb. 4). Zur Herstellung wurde ein ca. 30 cm langes Schlauchstück in der Mitte gereckt und hier unter einem Winkel von 45 Grad getrennt. Das jeweils andere Ende wurde vorsichtig auf die Luer-Nadel aufgezogen.

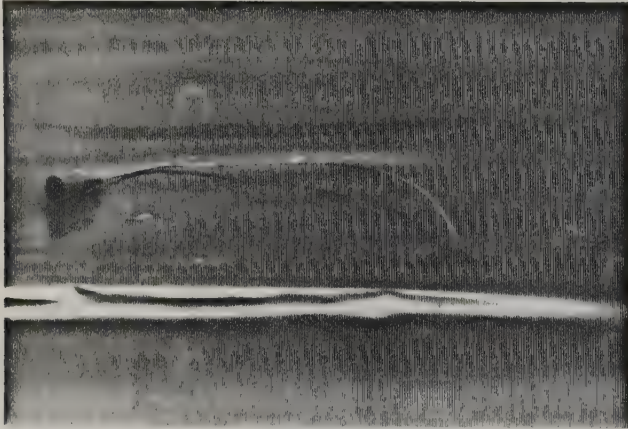


Abb. 4: Katheter zur Kanülierung des Ductus choledochus

2.2.4 Sonstige Geräte

Als Normalzentrifuge wurde das Modell Rota Silenta K der Fa. Hettich verwendet. Zur Herstellung der Lineargradienten (siehe 3.1.2.2.3) wurde eine Ultrazentrifuge (Spinco L50) mit 23 Grad - Rotor benutzt. Als Temperierer eigneten sich Wasserbäder der Fa. Köttermann, wobei der Typ #3047 (Schüttelwasserbad, max. ca. 120 Linearbewegungen/Minute) zur Inselisolation (siehe 2.4), der Typ #3043 zur Zelldissoziation (siehe 2.5) diente. Wegen der recht groben Temperatureinstellung der beiden Modelle wurden die Temperaturen fixiert und vor jedem Versuch nachkontrolliert.

2.2.5 Glaswaren

Alle verwendeten Glaswaren wurden mit Siliconlösung (Serva #35131) behandelt und die Beschichtung 1 Stunde bei 100 °C eingebrannt.

2.3 Tiere

Als Spendertiere wurden Sprague-Dawley-Ratten, vornehmlich weiblichen Geschlechts, mit einem Gewicht von 180 - 280 g verwendet. Die Ratten wurden bis zum Versuch mit Standard-Diät (Altromin) ad libitum gefüttert.

2.4 Inselisolation

2.4.1 Pankreasentnahme

Die Versuchstiere (normalerweise 8 - 10 pro Versuchstag) werden mit 80 - 100 mg/kg Inactin bzw. Nembutal intraperitoneal narkotisiert. Die Narkose tritt im allgemeinen nach 3 - 5 Minuten ein.

Die Tiere werden auf einem Operationsbrett befestigt und die Bauchdecke mit dickflüssigem Paraffin eingerieben, um ein Verschleppen der Fellhaare zu vermeiden. Die Bauchdecke wird durch einen Kreuzschnitt breit eröffnet.

Sodann wird der Gallengang identifiziert und an der Einmündung in das Duodenum mit einer gebogenen Moskitoklemme abgeklemmt. Hierdurch wird der Gallengang etwas aufgestaut und läßt sich leichter präparieren. Zur besseren Darstellung wird eine weitere gebogene Moskitoklemme im Leberhilus platziert, wodurch sich der Gallengang anspannt. Kurz hinter der Vereinigung von Ductus hepaticus dexter und Ductus hepaticus sinister wird der Gallengang aus dem umgebenden Gewebe mit Hilfe einer geraden Lidschere herauspräpariert. Nach vorsichtiger Eröffnung des Gangs wird der Gallengangskatheter eingeführt. Die Einschuböffnung wird dadurch abgedichtet, daß der Gallengang samt eingelegtem Katheter mit einer anatomischen Pinzette gefaßt wird, wobei der Gang in die Rillen der Pinzette zu liegen kommt.

Hierauf werden ca. 3 ml kalte Neutralrotlösung langsam (ca. 1 min) in den Gallengang injiziert. Dadurch bläht sich das Pankreas in der Reihenfolge Kopf-Korpus-Schwanz unter gleichzeitiger Rosafärbung. Schon zu diesem Zeitpunkt werden Inseln als distinkte, gerade wahrnehmbare, tiefrot gefärbte Punkte sichtbar. Das Pankreas wird nun samt Milz herauspräpariert. Zur Erleichterung der Präparation wird die Blutzirkulation unterbrochen, indem der Thorax eröffnet wird und das Herz an der Basis abgetrennt wird. Der Magen wird nach cranial, Dünn- und Dickdarm nach links unten verlagert. Nun ist das Pankreas in seiner ganzen Ausdehnung sichtbar, wobei der Kopf im aufgespannten Duodenal-C liegt. Der Kopf wird, am Pylorus beginnend, mit Hilfe einer feinen Präparierschere bis zur Flexura duodenojejunalis abgetrennt, ebenso wird das Mesocolon durchtrennt. Die Milz wird mit einer anatomischen Pinzette gefaßt, wodurch die Ligamente zwischen Pankreas und Abdomenrückwand sichtbar werden und durchtrennt werden können (das Pankreas liegt bei der Ratte, im Gegensatz zum Menschen, intraperitoneal(63)). Durch leichten Zug an der Milz wird der Mesanteriorstiel sichtbar und kann ebenfalls durchtrennt werden. Das herauspräparierte Pankreas wird bis zur weiteren Verwendung in kaltem HBSS gelagert. Die gesamte Pankreasentnahme nimmt bei etwas Übung ca. 4 - 5 Minuten pro Tier in Anspruch.

2.4.2 Vorbereitung des Inkubationsgemischs

Ein Pankreas wird in anatomischer Lage in eine Petrischale gelegt und als erstes von Milz und Fettgewebe (an Ober- und Unterrand sowie im Leberhilus) befreit.

Sodann werden, soweit möglich, Lymphknoten entfernt, die als 1 - 3 mm große, flache, beige, am Rand braun gefärbte Scheibchen u. a. am Oberrand und im Milzhilus sichtbar sind.

Je 2 - 3 Pankreata (entsprechend einem Volumen von ca. 5 ml) werden in einem Polystyrolgefäß mit konischem Boden (Fa. Greiner, # 201170) plziert und mit geraden Scheren 2 Minuten lang möglichst schnell geschnitten, wobei die

maximal erreichbare Frequenz naturgemäß interindividuell verschieden ist. Nach 1 min werden ca. 5 ml kalter HBSS-Puffer zugegeben, um ein besseres Aufschwimmen der Gewebestücke zu ermöglichen.

Nach dem Zerschneiden wird das Gewebe in 200 ml kalten HBSS-Puffer überführt, um die freigewordenen digestiven Enzyme auszuwaschen. Nach einer Standzeit von 2 Minuten wird der überstehende Puffer, auf dessen Oberfläche sich auch freigewordenes Fettgewebe befindet, abdekantiert. Um eine zuverlässige Messung des gewonnenen Gewebes zu ermöglichen, wird das Sediment in einen 50 ml-Perfusorspritzenkolben, dessen Auslauf mit einem Stopfen verschlossen ist, überführt.

Alle Pankreata werden auf diese Weise behandelt, das Gewebe in Perfusorspritzenkolben gesammelt und gemeinsam noch dreimal mit HBSS-Puffer gewaschen. Eine effektive Durchmischung mit frischem Puffer wird dadurch erreicht, daß dieser mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle 1 gauge unterhalb des Flüssigkeitsspiegels eingebracht wird, wodurch auch eine unerwünschte Schaumbildung vermieden wird. Nach dem letzten Waschen wird der Perfusorkolben mit frischem Puffer bis zum Oberrand gefüllt, der Spritzenstempel vorsichtig aufgesetzt und die gesamte Spritze so gedreht, daß sich der Auslauf oben befindet. Eventuell vorhandene Luft wird vorsichtig herausgedrückt und das Gewebe, das jetzt nach unten sedimentiert, durch leichtes Aufklopfen auf der Tischoberfläche verdichtet. Sodann wird nach dem Waschvorgang der gesamte überstehende Puffer möglichst vollständig entfernt und das Volumen des Gewebes gemessen (bei 10 Tieren ca. 23 - 25 ml).

2.4.3 Inkubation mit Kollagenase

Verwendet wird die Kollagenase Typ V der Fa. Sigma (#C9263) mit Kollagenaseaktivitäten von 260 - 600 Einheiten/mg. Diese wird bei jeder Isolation in einer Konzentration von 8 mg/ml Gewebe frisch in kaltem, albuminfreien HBSS gelöst, wobei das Volumen der Lösung dem des Gewebes entspricht.

Das erhaltene Gewebe wird zu gleichen Teilen auf zwei Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen verteilt, die Perfusorspritzen mit der Kollagenaselösung gespült und diese ebenfalls gleichmäßig auf die beiden Kolben verteilt. Dies ergibt eine Kollagenase-Endkonzentration von 4 mg pro ml Inkubationsgemisch. Diese Mischung wird vorsichtig von Hand geschüttelt. Beide Gefäße werden in einem auf 37 °C aufgeheizten Temperierschüttler (siehe 2.2.4) plaziert und mit maximaler Schüttelfrequenz geschüttelt. Da aber auch die maximale Frequenz des verwendeten Wasserbads zum effektiven Gewebs-aufschluß nicht ausreicht, werden die Gefäße alle 2 Minuten aus dem Wasserbad genommen und entweder von Hand oder auf einen Vortex-Schüttler (Fa. Bender & Hobein) bei maximaler Schüttelfrequenz geschüttelt, wobei jeweils einmal Handschütteln von zweimal Vortexschütteln gefolgt wird.

Die Gesamtinkubationszeit mit Kollagenase, die durch Versuche zu ermitteln ist, variiert von Charge zu Charge und beträgt bei gut geeigneten Kollagenase-Chargen 12 - 14 Minuten.

Am Ende der Inkubation wird die Reaktion dadurch gestoppt, daß zum einen die Erlenmeyerkolben mit 40 ml kaltem HBSS aufgefüllt werden und zum anderen der gesamte Inhalt über ein Teesieb in ein 300 ml-Becherglas überführt wird, in dem 100 ml kalter HBSS vorgelegt wird.

Das Teesieb, das mit Puffer vorgespült ist, dient erstens zum Zurückhalten unverdauter Gewebsteile und zweitens zum Abtrennen von Lymphknoten, die bei der manuellen Präparation (siehe 2.4.2) nicht entfernt werden konnten. Die Lymphknoten haben im Ficoll-Hypaque-Gradienten (siehe 2.4.4) eine ähnliche Auftriebsdichte wie Inseln, können in diesem Stadium jedoch aufgrund ihrer unterschiedlichen Größen (1 - 3 mm versus 50 - 400 μ m bei Inseln) ausgesondert werden. Das Sieb wird daraufhin mit einem feinen Pufferstrahl gespült, um eventuell zurückgehaltene Inseln, die als rote Punkte sichtbar sind, nicht zu verlieren.

Die erhaltene Suspension wird auf vier 80 ml-Zentrifugengläser (Schrott #2160124) verteilt. Das Inkubationsgemisch wird zweimal mit 60 - 70 ml kaltem albuminhaltigen HBSS-Puffer gewaschen, indem sie jeweils 5 min. bei ca. 200 g zentrifugiert und der erhaltene Überstand vorsichtig abdekantiert wird. Die erhaltenen Sedimente werden in einem 80-ml-Zentrifugenglas gesammelt, mit albuminhaltigen HBSS (siehe 2.1.1.2.2.) gründlich gemischt und nochmals wie angegeben zentrifugiert.

2.4.4 Diskontinuierlicher Ficoll-Hypaque-Gradient

Der Überstand wird nach dem letzten Waschvorgang scharf mit Pasteurpipette und Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Zentrifugat vorsichtig in 10 ml kalter Ficoll-Hypaque-Lösung mit der Dichte 1,090 g/l, welches zusätzlich 1 g/l Rinderserumalbumin enthält, aufgenommen. Diese Lösung wird mit Hilfe einer 10 ml-Glaspipette, die mit Ficoll-Hypaque vorgespült wurde, auf 4 neue 80 ml-Zentrifugengläser verteilt. Sodann wird sowohl die Glaspipette als auch das Zentrifugenglas, in dem sich das Sammelsediment befunden hat, 3 mal mit je 10 ml Ficoll-Hypaque-BSA-Lösung gespült, die wiederum auf die 4 Zentrifugengläser verteilt wird. Hierdurch wird erstens eine homogene Suspension erreicht und zweitens dafür gesorgt, daß das gelöste Sediment, dessen Dichte durch Pufferverschleppung geringer ist als 1,090 g/l, von frischem Ficoll-Hypaque unterschichtet ist.

Jedes Sediment wird mit 10 ml HBSS-Albumin überschichtet und der Gradient 15 Minuten bei 4 °C mit 800 g zentrifugiert. Am Ende der Zentrifugation sind die Inseln als gut wahrnehmbare Punkte an der Schichtengrenze erkennbar. Der gesamte Flüssigkeitsüberstand wird sehr vorsichtig in ein frisches 80 ml-Zentrifugenglas abdekantiert, mit der doppelten Menge HBSS-Albumin gut gemischt und 5 min mit 80 g zentrifugiert. Dies ist möglich, da das Sediment relativ fest am Boden des Glases haftet. Die Sedimente werden nach dem Abdekantieren der Überstände in einem 10 ml-Glasspitzröhrchen gesammelt, nochmals mit frischem HBSS-Albumin gemischt und nochmals wie oben zentrifugiert.

2.4.5 Mikroskopische Begutachtung

Das gesammelte Sediment wird vorsichtig in 2 ml HBSS-Albumin aufgenommen und mit einer silikonisierten Pasteurpipette, die vorher mit Puffer gespült wurde, in ein Bakteriologieschälchen (Nunc # 240045) überführt. Nun wird die Suspension im Auflicht durch ein Stereomikroskop mit 20 - 40facher Vergrößerung gegen einen schwarzen Hintergrund betrachtet. Gegen ihn heben sich nicht mit Neutralrot gefärbte Verunreinigungen, wie Gefäßteile, exokrines Gewebe etc. deutlich ab.

Durch leichtes zyklisches Bewegen der Petrischale können die Inseln im Zentrum angereichert werden. Die Verunreinigungen können nun am Rande abpipettiert werden, in eine zweite Petrischale überführt und dort ausverdünnt werden. Etwaige mitpipettierte Inseln werden zurücküberführt.

Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Vorgangs bleibt eine Inselfuspension zurück, die frei von Verunreinigungen ist. Die Anzahl der Inseln wird am günstigsten gegen einen weißen Hintergrund bestimmt.

2.5 Inselzellpräparation

Voraussetzung hierfür ist eine Inselpräparation, die frei von Verunreinigungen, insbesondere Gefäß- und Bindegewebszellen ist.

Diese Suspension wird in ein 10 ml-Spitzröhrchen überführt und 5 min bei 80 g zentrifugiert. Das Sediment wird dann in 2 ml Zelldissoziationspuffer (2.1.1.3.3) aufgeschüttelt. Das Spitzröhrchen wird für 5 min in ein auf 30 °C temperiertes Wasserbad gestellt, um definierte Inkubationsbedingungen zu erreichen.

Hierauf werden zu der Suspension 40 µl frisch aufgetaute DNase-Trypsin-Stammlösung (siehe 2.1.3.3) gegeben. Die mechanische Bearbeitung erfolgt durch vorsichtiges Aspirieren der am Boden des Spitzröhrchens sedimentierten Inseln in eine 1 ml-Tuberkulinspritze, die mit einem 18 gauge-Tef-

lon-Venenkatheter versehen ist. Der Inhalt der Tuberkulinspritze wird vorsichtig zurücküberführt und das Spitzröhrchen für 1 min wieder ins Wasserbad gestellt. In dieser Zeit setzen sich die noch nicht dissoziierten Inseln am Boden ab. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis keine Inseln mehr makroskopisch sichtbar sind, was im allgemeinen nach 12 Minuten der Fall ist.

Der gesamte Inhalt des Spitzröhrchens wird mit dem Teflonkatheter in eine 2 ml-Spritze aufgenommen und über ein 63 μ m-Nylon-Gewebe (Nybolt #90T, Fa. Bigman, Schweden), das sich in einem Millipore-Filterhalter befindet, mit geringem Druck filtriert, um Bindegewebsanteile und Kapillaren etc. zu entfernen. Das Filtrat wird in ein neues Spitzglas aufgenommen, in dem 5 ml kaltes RPMI-FKS (siehe 2.1.1.3.2) vorgelegt sind.

Alle verwendeten Materialien (Teflonkatheter, Tuberkulinspritze, Filter) werden mit RPMI-FKS vor- und nachgespült.

Durch Verwendung von kaltem RPMI-FKS wird die enzymatische Reaktion sowohl durch den Temperatureffekt, als auch durch die in fetalem Kälberserum enthaltenen Enzyminhibitoren und den Verdünnungseffekt zuverlässig und schnell abgebrochen.

Das gesammelte Filtrat wird zweimal in RPMI-FKS durch Zentrifugation für 5 min bei 4 ° C mit 80 g gewaschen und in 1 ml RPMI-FKS aufgenommen. Zur Zellzählung werden 1 Teil Suspension mit 1 Teil Zellzählungsfärbelösung (siehe 2.1.3.4) gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Unter einem Epifluoreszenzmikroskop, ausgerüstet mit FITC-Filtern, wird sowohl die Zellzahl als auch der Anteil der lebenden Zellen bestimmt.

Die Zellzahl wird durch Auszählen der Großquadrate und Multiplikation mit 20.000 (Volumen eines Großquadrats: 0,1 μ l = 1/10.000 des Gesamtvolumens, Verdünnung durch Färbelösung 1:2) bestimmt. Die lebenden Zellen sind durch die aktive Aufnahme von Acridinorange grün, die toten durch den Einbau von Ethidiumbromid in die DNA rot gefärbt.

2.6 Zellfixierung

Sollen die Inselzellen aus irgendwelchen Gründen nicht sofort für den Inselzelloberflächenantikörperassay verwendet werden, fixiert man sie in einer 4 %igen Paraformaldehydlösung.

Hierzu wird die gesamte Suspension (1 ml) in 9 ml frisch hergestellten Fixierungspuffer (siehe 2.1.1.4.2) überführt und 1 h bei 4 °C inkubiert. Das Paraformaldehyd wird durch zweimaliges Waschen mit 10 ml Konservierungspuffer (siehe 2.1.1.4.3) und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 4 °C mit 80 g entfernt. Das Zentrifugat wird zum Schluß in 1 ml Konservierungspuffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

2.7. Inselzelloberflächenantikörperassay

Verwendet werden Röhrchen der Fa. Sarstedt (# 73.1055), die zur Verhinderung der Adsorption von Immunglobulinen nach 2.1.3.8 behandelt werden. Außerdem werden Leerwerte (entspricht Serum und Tracer ohne Zellen) mitgeführt (siehe 3.3.2.4).

Alle Bestimmungen erfolgen in Dreifachwerten.

Fixierte Inselzellen (siehe 2.5) werden mit HNB-Puffer (siehe 2.1.1.4.1) in einer Konzentration von 1 Million Zellen pro ml in Lösung gebracht und vorsichtig gemischt. 50 µl dieser Suspension bzw. 50 µl Puffer zur Bestimmung der Leerwerte werden in ein präpariertes Röhrchen (s.o.), welches sich auf einem Temperierständer (Sarstedt # 95.1012) befindet, pipettiert. Dabei wird bei jeder Entnahme aus dem Vorrat die Suspension durch vorsichtiges Aspirieren gemischt, um eine konstante Zellkonzentration zu erreichen.

In die so vorbereiteten Röhrchen werden 50 µl des zu untersuchenden Serums, welches 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert wurde und mit HNB-Puffer 1 : 10 verdünnt wird, pipettiert, so daß sich eine Serumkonzentration von 1 : 20 ergibt.

Die Temperierständer werden von Hand vorsichtig, aber gründlich geschüttelt und 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach jeweils 20 Minuten wird nochmals von Hand geschüttelt. Der Abbruch der Reaktion wird wie folgt bewirkt: dreimaliges Waschen mit je 250 µl HNB-Puffer, Zentrifugation mit 2000 g für 30 Sekunden und anschließendem Absaugen der Überstände mit einem 8fach-Absaugkamm (Sarstedt, # 90.1351), der auf 25 µl Restvolumen justiert wurde.

Als Tracer wird ein mit ^{125}J (Bolton-Hunter-Methode) markiertes Protein A der Fa. Amersham-Buchler (#IM 144) verwendet, das eine spezifischen Aktivität von 30 µCi/µg und eine spezifische Konzentration von 0,1 µCi/ml aufweist. Dieser Tracer wird in einem Tris-EDTA-NaCl-Gelatinepuffer geliefert und vor dem Versuch mit HNB-Puffer 1 : 50 verdünnt. Zu jeder Probe (= Sediment + 25 µl Restvolumen) werden 50 µl dieser Tracerverdünnung gegeben, so daß sich für den Tracer eine Endverdünnung von 1 : 75 ergibt. Bei der Zugabe wird darauf geachtet, daß das Sediment aufgeschüttelt wird. Anschließend wird der Temperierständer wieder von Hand geschüttelt und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Der Abbruch der Reaktion erfolgt wie bei der Seruminkubation, diesmal jedoch durch viermaliges Waschen. Die Zählung wird in einem 16-Kanal-Gamma-Zähler der Fa. Nuclear-Enterprises vorgenommen.

Die Berechnung der spezifischen Bindung erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{spez. Bindung} = \frac{100(\text{Gesamtbindung} - \text{unspez. Bindung})}{\text{Gesamtaktivität}}$$

2.8 Statische Inkubation isolierter Inseln

Das Inkubationssystem (siehe 2.2.2) wird zusammengebaut und an das Temperierwasserbad sowie an die Sauerstoffversorgung angeschlossen. Während das System sich äquilibriert, werden jeweils 10 frisch isolierte Inseln (siehe 2.4) auf den Filtergeweben plaziert.

Sodann werden die 6 Filterhalter an der Halteplatte befestigt und in die 6 Pufferröhrchen, die mit je 5 ml BasalmEDIUM (Krebs-Henseleit-Puffer, s. 2.1.1.1, mit 3 mM Glucose) gefüllt sind, eingeführt. Nach einer Stunde werden die 6 Pufferröhrchen gegen 6 andere, die jetzt jedoch Stimulationsmedium (Krebs-Henseleit-Puffer mit 20 mM Glucose) enthalten, ausgetauscht. Nach einer weiteren Stunde wechselt man wieder zum BasalmEDIUM.

Die Abtrennung der Inkubationsmedien erfolgt häufig durch Zentrifugation. Das erstmals von Gerner beschriebene Verfahren (55), auf dem die hier beschriebene Methode beruht, bietet wesentliche Vorteile:

1. Die Abtrennung der Inkubationsmedien erfolgt schonender
2. Die Pufferverschleppung ist geringer. Dies macht sich u. a. beim Wechsel vom stimulatorischen (bei hoher Insulinausschüttung) zum substimulatorischen Medium bemerkbar.

Als BasalmEDIUM wurde Krebs-Henseleit-Puffer mit 3 mM Glucose, als Stimulationsmedium derselbe mit 20 mM Glucose gewählt. Inseln wurden, wie bereits beschrieben, isoliert und in Gruppen von 10 inkubiert (siehe 2.8). Als Kontrolle dienten Inseln, die während aller 3 Perioden der substimulatorischen Konzentration von 3 mM ausgesetzt waren.

Die Bestimmung der Insulinausschüttung erfolgt mit Hilfe eines Radioimmunoassays (siehe 2.11). Die Berechnung der Insulinausschüttung pro Insel und Stunde geschieht nach folgender Formel:

$$\text{Ausschüttung} = \frac{\text{gemessene Konzentration} \cdot \text{Inkubationsvolumen}}{\text{Anzahl Inseln}}$$

Da die Inselgröße stark variiert (Bereich 50 - 350 μm) und die sezernierende Inselmasse in dritter Potenz vom Durchmesser abhängt, daher eine beträchtliche Intra- und inter-assayvariabilität unvermeidlich ist, wird für den statistischen Vergleich die Basalsekretion gleich 1 gesetzt und

die stimulierte Sekretion als ein Vielfaches von dieser ausgedrückt.

2.9 Perifusion isolierter Inseln

Als erstes werden die Verbindungen zwischen Temperierblock-
unterteil, Förderpumpe und Fraktionensammler hergestellt
und das System retrograd mit BasalmEDIUM aufgefüllt. Sodann
werden in die hierfür vorgesehenen Vertiefungen je ein Fil-
ter, welches vorher mit Puffer befeuchtet wurde, zwischen
zwei Silikondichtungsringen plazierte. Sodann stellt man
die Verbindungen zwischen Pufferreservoir, Dreiwegeventil
und Temperierblockoberteil her und füllt diese ebenfalls
mit Puffer, wobei auf Blasenfreiheit zu achten ist. Nun
werden Ober- und Unterteil fest miteinander verschraubt.
Nachdem die Verbindungen zu Temperierwasserbad und Sauer-
stoffzufuhr hergestellt und die benötigten Puffermengen
eingefüllt worden sind, öffnet man bei geschlossenen Puf-
ferreservoirventilen die Zuführungen am Temperierblockober-
teil und plazierte jeweils 50 frisch isolierte Inseln (siehe
2.4), die unter einem Stereomikroskop ausgesucht wurden,
mit Hilfe einer Pasteurpipette auf den Filtern. Sodann wer-
den die Verbindungen wiederhergestellt, wobei man auch hier
wieder auf Luftfreiheit achten muß, und die Förderpumpe
wird in Betrieb gesetzt (komplettes System siehe Abb. 5).

In den ersten 10 Minuten werden keine Proben gesammelt,
da das während des Sortier- und Einfüllvorgangs sezernierte
Insulin falsch-hohe Spiegel vortäuschen würde. Die Proben-
entnahme erfolgt nach folgendem Schema:

1. 30 Minuten BasalmEDIUM, entsprechend 3mM Glukose, Zeit-
intervall 5 Minuten
2. 60 Minuten Stimulationsmedium, entsprechend 10, 20 oder
40 mM Glukose, Zeitintervall 10 x 1 Minute, 10 x 2 Minu-
ten, 10 x 30 Minuten
3. 30 Minuten BasalmEDIUM, Zeitintervall 5 Minuten

Das von der Pumpe geförderte Volumen wird, um zufällige Schwankungen auszuschließen, jeweils über das ganze Intervall für die vier Kanäle getrennt gesammelt, ein 500 μ l-Aliquot wird entnommen und bei - 20 °C zur späteren Insulinbestimmung (siehe 2.11) gelagert.

Die Berechnung der pro Insel und Minute sezernierten Insulinmenge erfolgt nach folgender Formel:

sezernierte Menge (μ U/Insel $\cdot$ min) =

$$\frac{\text{gemessene Konzentration}}{\text{Anzahl Inseln}} \cdot \frac{\text{pro Minute gefördertes Volumen}}{\text{Inseln}}$$

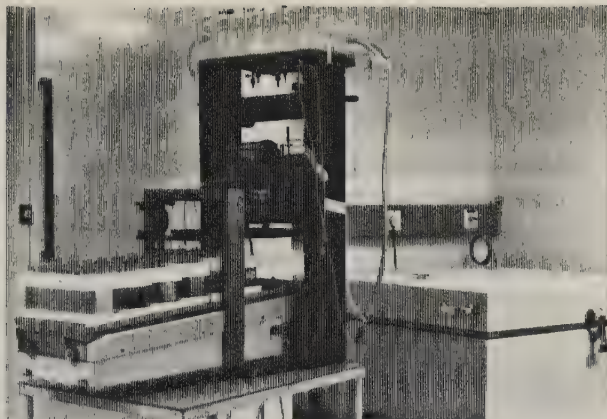
Da es auch bei der Perifusion aus den bei der Inkubation erwähnten Gründen (siehe 2.8) zu beträchtlichen Interassay-variabilitäten kommt, werden auch hier die erhaltenen Werte normalisiert. Als Bezugspunkt dient hier jedoch nicht die Basalsekretion, sondern die gesamte, aus den Inseln extrahierbare Insulinmenge, die mit Hilfe einer sauren Alkohol-extraktion (siehe 2.10) bestimmt wird. Die extrahierbare Insulinmenge ersetzt dann in obiger Formel die Anzahl der Inseln; die sezernierte Insulinmenge wird in μ U/mU $\cdot$ min ausgedrückt.

Die Effektivität der Pufferbegasung wurde vor den Versuchen mit Hilfe der Astrup-Methode bestimmt. Die ermittelten Werte (siehe Tabelle 1) erschienen ausreichend. Der pH-Wert wurde während der Versuche gemessen und blieb in dem Bereich von 7.38 bis 7.43. Das Totvolumen zwischen Umschaltventil und Probeentnahmestelle wurde mit Hilfe von radioaktivem Insulin gemessen und bewirkte eine Totzeit von 2 Minuten. Diese wurde nicht in Abzug gebracht.

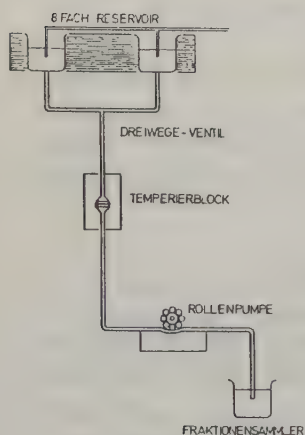
	pO ₂ (mm Hg)	PCO ₂ (mm Hg)	pH
Vorratsgefäß	600,25 +/- 3,49	37,73 +/- 0,11	7,399 +/- 0,005
Fraktionensammler	603,00 +/- 5,84	37,68 +/- 0,05	7,403 +/- 0,007

Tab. 1: Effektivität der Pufferbegasung (Werte von 4 Perifusionen, MW +/- SEM)

b)



a)



c)

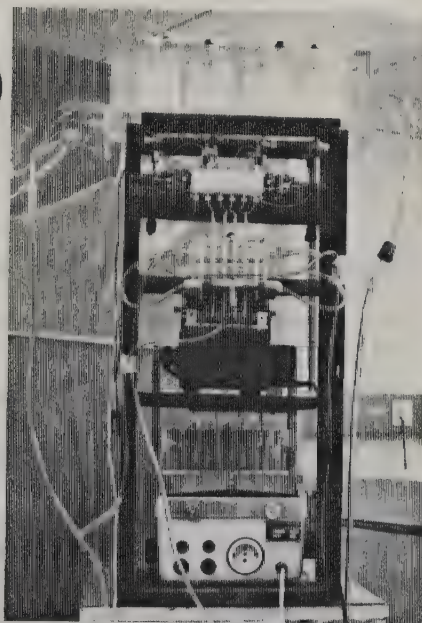


Abb. 5: System zur Perfusion isolierter Inseln

a) schematisch

b) Seitenansicht

c) Ansicht von hinten

2.10 Insulinextraktion

Hierzu wird eine modifizierte Methode (2) nach Davoren (32) verwendet. Inseln oder bei der Perifusion mit Inseln beschichtete Filterpapiere werden in je 0,5 ml Aqua bidest lysiert, die Lösung durch Ultraschall (50 W für 30 sec) homogenisiert. Die erhaltene Lösung wird in einem Beta-II-Lyophilisator der Fa. Christ gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird mit dem gleichen Volumen Aqua bidest rekonstituiert, mit 1 ml salzsaurem Alkohol (siehe 2.1.3.5) gemischt, 2 Stunden bei 4 °C inkubiert, 20 Minuten mit 3000 g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Sediment wird wiederum mit 1 ml salzsaurem Alkohol, jedoch 18 Stunden bei 4 °C inkubiert und wie oben abzentrifugiert.

Beide Überstände werden gemischt und in einem Exsikkator getrocknet. Der erhaltene Niederschlag wird in Sorinpuffer aufgenommen und mit diesem adäquat ausverdünnung. Die in Vorversuchen mit Hilfe von radioaktivem Insulin bestimmte Ausbeute betrug 98 % +/- 2 % (MW +/- SEM).

2.11 Insulinbestimmung / Radioimmunoassay

Die Messung der Insulinkonzentrationen erfolgte nach der von Hales und Randle beschriebenen Doppelantikörpermethode.

Als Standard wird ein Ratteninsulinstandard der Fa. Novo (#410, Chargennr. 791009, spezifische Aktivität: 21,4 U/mg) verwendet, als Antikörper ein Doppelantikörper der Fa. Wellcome (# RD12, eine Gemisch aus Meerschwein-Anti-Insulin-IgG und Ziegen-Anti-Meerschwein-IgG ; Lyophilisat, in 8 ml Aqua bidest zu lösen), als Tracer ein ¹²⁵J-Rinderinsulin der Fa. Behring mit einer Aktivität von 0,167 mCi/mg (Assayverdünnung 1 : 20 mit Sorinpuffer, siehe 2.1.1.5).

Je 50 µl Standard oder Probe werden gemischt und 6 Stunden bei 4 °C inkubiert. Sodann werden 50 µl Tracerverdünnung zugegeben, gemischt und 18 Stunden bei 4 °C inkubiert.

The Government of the United States of America hereby certifies that the following is a true and correct copy of the original as the same appears on the records of the Department of the Interior.

This is to certify that the following is a true and correct copy of the original as the same appears on the records of the Department of the Interior.

W. A. RORER, Secretary.

This is to certify that the following is a true and correct copy of the original as the same appears on the records of the Department of the Interior.

This is to certify that the following is a true and correct copy of the original as the same appears on the records of the Department of the Interior.

This is to certify that the following is a true and correct copy of the original as the same appears on the records of the Department of the Interior.

This is to certify that the following is a true and correct copy of the original as the same appears on the records of the Department of the Interior.

This is to certify that the following is a true and correct copy of the original as the same appears on the records of the Department of the Interior.

3. Ergebnisse

3.1. Inselisolation

Die Methode von Witte (184) beruht im wesentlichen auf dem von Moskalewski (133) angegebenen Verfahren. Hierbei wird kleingeschnittenes Pankreasgewebe über einen definierten Zeitraum mit Kollagenase inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion werden Inseln unter einem Stereomikroskop aus dem Gewebsbrei herauspipettiert. Lacy (94) ergänzte die Methode dahingehend, daß vor der Pankreasentnahme das Organ über den Ductus pancreaticus mit Pufferflüssigkeit gebläht wird.

Als Hauptschwierigkeiten stellten sich bald zwei Punkte heraus:

1. Es ist schwierig, die optimalen Bedingungen der Kollagenaseinkubation, wie Dauer, Temperatur, Volumen oder Schüttelfrequenz und deren Auswirkungen abzuschätzen, da diese Beurteilung mikroskopisch erfolgt.

Es wurde also nach einem Verfahren gesucht, welches die Beobachtung der Inselfreiwerdung während des Inkubationsvorgangs gestattet, dabei jedoch die Inseln nicht schädigt.

2. Die Trennung der Inseln vom angedauten exokrinen Gewebe mit Hilfe der Pipettiermethode ist sowohl zeitraubend als auch schädigend für die Inseln, da sie während des gesamten Sortiervorgangs proteolytischen Enzymen ausgesetzt sind.

Hier benötigte man eine Methode, die eine Trennung von Inseln und exokrinem Gewebe auf schnellem und effektivem Wege ermöglicht.

3.1.1 Inselanfärbung

Hierzu bot sich das von Lacy (94) erwähnte und von Scharp (165) wieder publizierte Neutralrotverfahren an.

Neutralrot ist ein Azinfarbstoff, der in saurer bis neutraler Lösung eine rote Farbe besitzt, gut wasserlöslich ist und eine geringe Toxizität aufweist (113). Inseln werden von ihm stärker angefärbt als exokrines Gewebe.

3.1.1.1 Anfärbung mit Neutralrot intravenös

Bei diesem Verfahren wurden Ratten laparotomiert (siehe 2.4.1), die Vena cava freipräpariert und ein Katheter (siehe 2.2.3) eingeführt. Durch diesen Katheter wurden 50 ml Hankspuffer, der 67 mg/l Neutralrot enthielt, (165), mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min injiziert.

Hierdurch konnte jedoch keine Anfärbung der Inseln erreicht werden.

3.1.1.2 Anfärbung mit Neutralrot intraarteriell

Ratten wurden laparotomiert, die Aorta in Höhe der Bifurkation freipräpariert, ein Katheter bis zur Höhe des Abgangs des Truncus coeliacus eingeführt und 50 ml Hankspuffer, der 67 mg/l Neutralrot enthielt, mit Hilfe einer Perfusorpumpe und einer Geschwindigkeit von 10 ml/min injiziert. Um eine Hypervolämie zu vermeiden, wurde die Vena cava zur Entlastung eingeschnitten und das austretende Blut-Puffergemisch mit Zellstofftupfern entfernt.

Durch dieses Verfahren wurde eine sehr gute Anfärbung der Inseln erreicht. Sie wurden dadurch schon bei der Pankreasentnahme als gerade sichtbare, tiefröte Punkte innerhalb eines leicht rosa gefärbten Pankreas wahrnehmbar.

Als Nebeneffekt trat eine Rosafärbung des gesamten Tieres auf.

3.1.1.3 Anfärbung durch Inkubation mit Neutralrot

Da das oben beschriebene Verfahren für die Aortenpräparation pro Tier zusätzlich ca. 20 Minuten in Anspruch nimmt, zwischen Pankreasentnahme und Kollagenaseinkubation wegen der proteolytischen Enzyme jedoch möglichst wenig Zeit vergehen sollte, wurde nach einer Methode gesucht, die Anfärbung in kürzerer Zeit zu erreichen.

Als eine Möglichkeit bot sich hierzu die Inkubation des kleingeschnittenen Pankreasgewebes (siehe 2.4.2) mit Neutralrotlösung an.

Zu diesem Zweck wurden Pankreata nach der unter 2.4.1 beschriebenen Methode gewonnen, kleingeschnitten und für zwei Minuten mit Neutralrotlösung (2.1.3.1) bei 4 °C inkubiert. Dabei kam es nur zu einer sehr ungleichmäßigen Anfärbung: während die Ränder der Gewebestückchen so stark gefärbt wurden, daß kein Unterschied mehr zwischen exokrinem Gewebe und Inseln erkennbar war, hatte das Neutralrot das Zentrum noch nicht erreicht.

Aus diesem Grunde wurde dieses Verfahren nicht weiterverfolgt.

3.1.1.4 Anfärbung über den Ductus pancreaticus

Die Möglichkeit der Inselanfärbung über den Pankreasgang bot sich an, da die Präparation des Ductus choledochus und das Blähen des Pankreas mit Puffer schon Bestandteile des von Lacy (94) beschriebenen Verfahrens ist. Hierbei wurden Ratten laparotomiert (2.4.1), der Gallengang an der Vereinigung der beiden Ductus hepatici freipräpariert und über einen Gallengangkatheter 10 ml Neutralrotlösung (siehe 2.1.3.1) pro kg Körpergewicht unter konstantem, vorsichtigen Druck injiziert.

Auch hierdurch konnte eine gute Darstellung der Inseln erreicht werden, wobei die Farbintensität geringfügig in Richtung Pankreasschwanz abnahm. Als Nebeneffekt wurde

das Pankreasgewebe von umgebenden, nativ gleich gefärbten Strukturen, wie Fettgewebe durch seine Rosafärbung demarkiert.

Da die Anfärbung der Inseln qualitativ gleich war wie unter 3.1.1.2, nach dem eben beschriebenen Verfahren jedoch keine zusätzliche Zeit in Anspruch nahm, wurde dieser Methode den Vorzug gegeben.

3.1.2 Dichtegradienten

Will man eine effektive Trennung von exokrinem und endokrinem Gewebe erreichen, ohne dazu die sehr zeitintensive "Handauslese" zu benutzen, so stehen einem neben der Trennung durch Filtration (138; diese Methode fand in der Literatur jedoch keine Bestätigung) vor allem die verschiedenen Methoden der Dichtegradiententrennung zur Verfügung.

Als Materialien hierzu wurden in der Literatur erwähnt:

- a) Saccharose (94), welche wegen der zur Herstellung der benötigten Dichte erforderlichen extremen Hyperosmolarität nur historisches Interesse besitzt
- b) Ficoll 400, ein Saccharose-Polymer mit einem durchschnittlichem Molekulargewicht von 40.000 Daltons
- c) Ficoll-Isopaque, ein Gemisch aus Ficoll (s. o.) und Isopaque, einem trijodierten Kontrastmittel
- d) Percoll, ein Kolloid, bestehend aus polyvinylpyrrolidonbeschichteten Silica-Partikeln
- e) das wenig gebräuchliche Metrizamide (155), ebenfalls ein trijodiertes Kontrastmittel.

3.1.2.1 Versuche mit Ficoll

Mit Ficoll, welches erstmals 1970 (55) verwendet wurde, werden viele in der Literatur erwähnte Dichtegradienten hergestellt. Seine Toxizität durch eventuell vorhandene

niedermolekulare Begleitsubstanzen wurde durch Sharp (166) untersucht, der eine Dialyse vor Verwendung dieser Substanz für notwendig erachtete.

Als Ausgangsmethode diente das von Lernmark (104) erwähnte Verfahren.

Hierzu wurde Pankreasgewebe, wie in 2.4.1 - 2.4.3 beschrieben, gewonnen und mit Kollagenase inkubiert. Das erhaltene Sediment wurde in Ficoll-Stammlösung (22,8 % w/w, siehe 2.1.2.2) gelöst und mit Ficoll-Lösungen der Konzentrationen 21,1 % und 19,84 % sowie 10,61 % überschichtet. Der erhaltene Gradient wurde 10 Min. bei 4 °C und 800 g zentrifugiert.

Hierdurch konnte jedoch nicht die erwähnte Trennung (104) erreicht werden. Statt der erwarteten Insel-Anreicherung zwischen den Konzentrationen 21,1 % und 19,84 %, befanden sich ein Teil der Inseln noch in der 22,8 %-Stammlösung, der andere Teil befand sich im Sediment.

Eine Änderung der Schichtenfolge (25 %, 20 %, 15 %, 10 %) und Erhöhung der Stammlösungskonzentration auf 30 % brachte keine überzeugenden Vorteile: zwar wurde eine gewisse Anreicherung zwischen den Konzentrationen 30 % und 25 % erreicht, jedoch verblieben ca. 80 % der Inseln im Sediment. Auch in der praktischen Handhabung erwies sich Ficoll wegen der hohen Viskosität bei dieser Konzentration und der starken Trübung als weniger geeignet.

3.1.2.2 Versuche mit Percoll

Percoll als neuester kommerziell erhältlicher Dichtegradient bietet gegenüber Ficoll aufgrund der geringeren Viskosität und Osmolarität seiner Lösungen bei gleicher Dichte einige Vorteile und findet daher auch in der Inselisolation Verwendung (21, 22). Außerdem korreliert die Dichte der proteinfreien Lösung mit dem Refraktionsindex linear und kann daher sehr einfach und genau kontrolliert werden.

3.1.2.2.1 Erstellung einer Eichgeraden Dichte/Refraktionsindex

Da, wie erwähnt, die Dichte einer proteinfreien Percoll-Lösung mit dem Refraktationsindex der Lösung korreliert, wurde in einem Vorversuch eine Eichgerade Dichte versus Refraktationsindex erstellt.

Mit Hilfe einer Ultrazentrifuge (siehe 2.2.4) wurden nach Applikation Lineargradienten hergestellt. Durch Mischen von isosmotischer Stammlösung (siehe 2.1.2.3) mit Hanks-puffer wurden Lösungen mit Percollkonzentrationen von 18, 27, 36, 45, 63, 72 und 81 Prozent hergestellt.

Als externe Dichtereferenz dienten "Marker-Beads" (Fa. Pharmacia) der Dichten 1.017, 1.034, 1.050, 1.062, 1.067, 1.088, 1.097, 1.120 g/ml.

Die Konzentrationen waren so gewählt, daß sich rechnerisch Dichten im Bereich der Beads-Dichten ergaben. Von diesen Lösungen wurden je 20 g ausgewogen und 25 min mit 20000 g zentrifugiert.

Hierdurch wurde ein sigmaförmiger, kontinuierlicher Gradient mit der Ausgangsdichte als Wendepunkt hergestellt und eine breite Aufspaltung um diesen Bereich erreicht. (Abb.6)

Aus dem Bereich, in dem sich die Marker-Beads einstellten, wurden dann vorsichtig 10 µl-Proben entnommen und der Refraktationsindex mit einem Refraktometer (Zeiss) bestimmt. Hieraus ergab sich die Korrelationsgerade:

$\text{Dichte} = 6,642 \cdot \text{Refraktionsindex} - 7,85$

mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,99918$

3.1.2.2.2 Bestimmung der Auftriebsdichte von Inseln in Percoll

Hierzu wurden Inseln nach 2.4.1 bis 2.4.3 isoliert, unter einem Stereomikroskop mit Hilfe einer fein ausgezogenen Pasteurpipette aus dem erhaltenen Gewebegemisch herauspipettiert und zweimal gewaschen. Die Inseln, neben einem geringen Anteil exokrinen Gewebes, der unvermeidlicherweise

mitpipettiert wurde, wurden auf einen kontinuierlichen Gradienten, den man aus einer 54 %igen Percoll-Lösung hergestellt und 25 min mit 20.000 g ultrazentrifugiert hat, vorsichtig aufpipettiert und mit 800 g 15 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert.

Als Kontrolle diente ein identisch hergestellter Gradient, der jedoch als externe Referenz Marker-Beads enthielt.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 6:

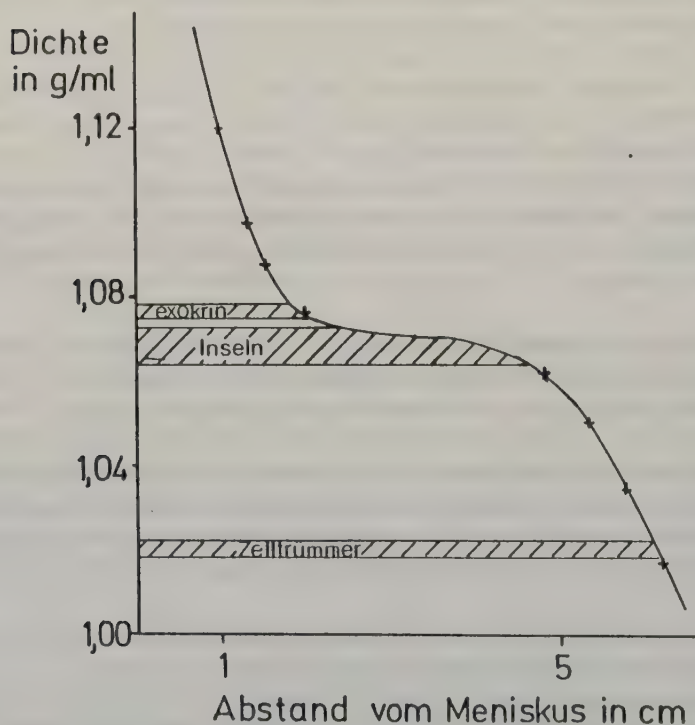


Abb. 6: Trennung isolierter Inseln im isoosmotischen linearen Percollgradienten von exokrinem Gewebe und Zelltrümmern

Man erkennt deutlich eine Auftrennung in drei Fraktionen:

1. eine leichte Fraktion, bestehend aus Zelltrümmern,
2. eine mittelschwere Fraktion, bestehend aus intakten Inseln
3. eine nur geringfügig schwerere Fraktion, die exokrines Gewebe enthält.

3.1.2.2.3 Trennung im kontinuierlichen Percollgradienten

Als nächstes wurde versucht, eine Trennung von exo- und endokrinem Gewebe im kontinuierlichen Gradienten zu erreichen.

Hierbei zeigte sich jedoch, daß das erhaltene Inkubationsgemisch eine so starke Verklumpungstendenz hat, daß eine Trennung nicht mehr möglich ist.

Dieser Effekt wurde schon von Buitrago (23) erwähnt, jedoch bei der Arbeit mit ob/ob-Mäusen. Sein Vorschlag der Vorinkubation des Gemisches mit DNase bot sich als Lösungsmöglichkeit an.

Zu diesem Zweck wurden pro Tier 4 kontinuierliche Gradienten, davon einer als Kontrollgradient, wie bei 3.1.3.2 angegeben, hergestellt.

Das durch Kollagenaseverdauung erhaltene Gemisch wurde zweimal gewaschen, 2 min bei Raumtemperatur im gleichen Volumen Puffer, welcher 200 µg/ml DNase I (Boehringer) enthielt, inkubiert und zweimal in Puffer gewaschen.

Sodann wurden je 400 µl des aufgeschüttelten Sediments auf einen kontinuierlichen Gradienten aufpipettiert und mit 800 g bei 4 °C 20 Minuten lang zentrifugiert. Hierdurch konnte eine gute Aufspaltung der verschiedenen Fraktionen erreicht werden, wobei sich Zelltrümmer bei Dichten leichter als 1,050 g/ml, Inseln bei den Dichten 1,062 bis 1,076 g/ml und das exokrine Gewebe bei Dichten um 1,088 g/ml einstellten.

Da jedoch dieses Verfahren zu material- und zeitintensiv erschien, eine Erhöhung der Auftragsmenge ausschied (hierdurch wurde die kontinuierliche Schichtung des Gradienten zerstört) und außerdem eine zusätzliche Inkubation mit einem Enzym in beträchtlicher Konzentration nötig machte (vgl. z. B. DNase-Trypsin-Lösung zur Zelldissoziation, 2.1.3.3), wurde nach einer Alternative gesucht.

3.1.2.2.4 Trennung im diskontinuierlichen Percollgradienten

Hier bot sich das von Brunstedt (21, 22) beschriebene Verfahren an.

Dabei wurde das Inkubationsgemisch von einem Tier mit einer Percollösung der Dichte 1,060 g/ml überschichtet. Nach Zentrifugation mit 800 g für 20 min. konnte jedoch keine Trennung erreicht werden, da das Gewebe eine starke Kohärenz zeigte.

Daher wurde die Trennung mit Percoll verworfen.

3.1.2.3 Versuche mit Ficoll-Hypaque

Ficoll-Hypaque, eine Mischung aus einer Ficoll 400 - Lösung mit Hypaque, einem trijodierten Kontrastmittel, bietet gegenüber der reinen Ficoll-Lösung den Vorteil der geringeren Osmolarität und Viskosität. Dadurch können schärfere Banden und kürzere Einstellzeiten erreicht werden.

Die Trennung erfolgt hierbei jedoch nicht nur nach Auftriebsdichte und/oder Sedimentationsgeschwindigkeit, sondern wird durch Nebeneffekte wie Agglomeration verstärkt bzw. erst ermöglicht (Beispiel Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut).

Ficoll-Hypaque wurde erstmals von Tze (179) 1976 zur Isolierung von Inseln erwähnt.

3.1.2.3.1 Zwei-Schichten-Gradienten

Als Vorversuch wurde das Inkubationsgemisch von je einem Tier mit 10 ml Ficoll-Hypaque-Lösung der Dichte 1,090 g/ml gemischt und mit 10 ml albuminhaltigem Hankspuffer überschichtet. Durch Zentrifugation mit 800 g für 20 min. bei 4 °C konnte auf Anhieb eine scharfe Trennung erreicht werden (Abb. 7). Ähnlich wie bei den Versuche mit Percoll (siehe 3.1.2.2.2) ergab sich die typische Dreischichtung: (von unten) exokrin - Inseln, erkenntlich an der intensiven Rotfärbung - Zelltrümmer.

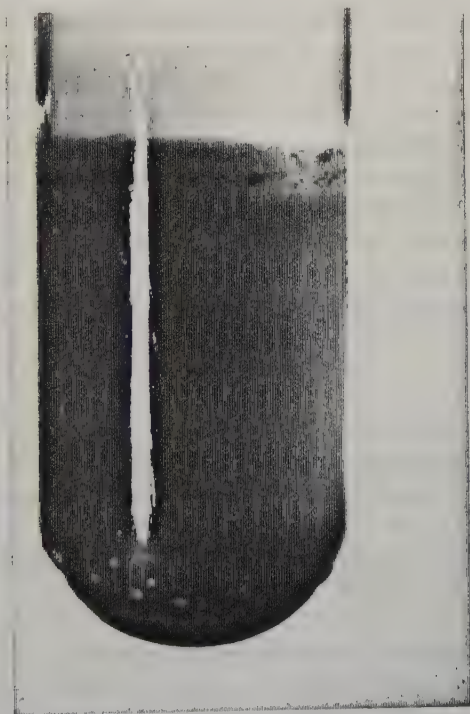


Abb. 7: Trennung Inseln - exokrines Gewebe im diskontinuierlichen Ficoll-Hypaque-Gradienten

Dabei ergab sich jeweils eine typische Schichtung: in der Grenzschicht befanden sich die mit Neutralrot gefärbten Inseln zusammen mit Zelltrümmern und Bindegewebsanteilen, in der Ficoll-Hypaque-Lösung befand sich kein nachweisbares Material, während sich das gesamte exokrine Material zusammen mit wenigen Inseln im Sediment befand.

Als praktische Schwierigkeit stellte sich das Lösen des Sediments in Ficoll-Hypaque-Lösung heraus: da es einerseits zur Vermeidung der Pufferverschleppung notwendig ist, ein genügend festes Sediment zu erhalten (hier durch Zentrifugieren mit 180 g für 5 min), erweist sich dies bei der Herstellung einer homogenen Suspension, die Grundvoraussetzung bei der Trennung ist, als hinderlich. Weder kräftiges Schütteln auf dem Vortex-Schüttler noch vorsichtigstes Zugabe von Ficoll-Hypaque-Lösung konnte verhindern, daß ein Teil, wenn auch ein viel geringerer als bei den Versuchen mit Percoll, in Klumpen zusammenhing. Der Zusatz von 1 g/l Rinderserumalbumin erhöht die Dichte unbedeutend von 1,090 g/ml auf 1,091 g/ml, verbessert jedoch die Löslichkeit des Sediments entscheidend. Eine weitere Steigerung der Homogenität der Lösung konnte dadurch erreicht werden, daß die Mischung durch die weitlumige Öffnung einer silikonisierten 10 ml - Glaspipette gezogen wird. Hierdurch werden noch verbleibende Gewebsklumpen in Lösung gebracht.

3.1.2.3.2 Drei-Schichten-Gradient

Da sowohl bei den Percoll- (siehe 3.1.2.2.3) als auch bei den Ficoll-Hypaque-Versuchen beobachtet werden konnte, daß die Zelltrümmer und Bindegewebsanteile eine geringfügig geringere Dichte als Inseln haben, wurde versucht, diese durch Einbringen einer etwas leichteren Zwischenschicht von den Inseln zu trennen.

Zur Bestimmung der optimalen Dichte dieses Zwischengradienten wurden durch Mischen von Ficoll-Hypaque mit albuminhaltigem Hankspuffer Lösungen der Dichten 1.077 g/ml, 1.062 g/ml, und 1.053 g/ml hergestellt.

Isolierte Inseln (siehe "Methoden") zusammen mit den Verunreinigungen, die sich nach der Trennung im Ficoll-Hypaque-Gradienten (siehe 3.1.2.3.1) befanden, wurden abpipettiert, gewaschen und abzentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in Ficoll-Hypaque der Dichte 1.077 g/ml gelöst, die erhaltene Mischung mit den Lösungen der Dichte 1.062 g/ml und 1.053 g/ml überschichtet und 10 Minuten mit 800 g bei 4°C zentrifugiert.

Als Ergebnis zeigte sich eine scharfe Bande an der Grenze der Dichten 1.053 und 1.062, die nur Verunreinigungen, jedoch keine Inseln enthielt. Die Inseln selbst befanden sich nur im Ficoll-Hypaque der Dichte 1.077 g/ml oder im Sediment und waren völlig frei von sichtbaren Verunreinigungen. Durch die Einbeziehung einer Zwischenschicht der Dichte 1.062 g/ml ist es also möglich, in einem einzigen Zentrifugationsschritt eine verunreinigungsfreie Inselpräparation zu erhalten.

Da jedoch, bei dem unter Methoden beschriebenen Verfahren, die Anzahl der Inseln zur Bestimmung der Ausbeute unter dem Stereomikroskop bestimmt wird und die Entfernung von Verunreinigungen mit Hilfe einer Pasteurpipette bei etwas Übung kaum Zeit in Anspruch nimmt, wurde beim endgültigen Verfahren, wie unter 2.4.4 - 2.4.5 beschrieben, auf die Einbeziehung der Zwischenschicht verzichtet.

Eine typische Inselpräparation stellt Abb. 8 dar.

Man erkennt neutralrotgefärbte Inseln unterschiedlicher Größe und Farbintensität.

3.1.3 Biochemische und histologische Charakterisierung der isolierten Inseln

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Isolation u. a. durch die Kollagenaseinkubation (164), jedoch auch durch das als Dichtegradient verwendete Ficoll (166) Schäden hervorrufen kann, die sich sowohl auf die Funktion als auch auf die Morphe auswirken können.

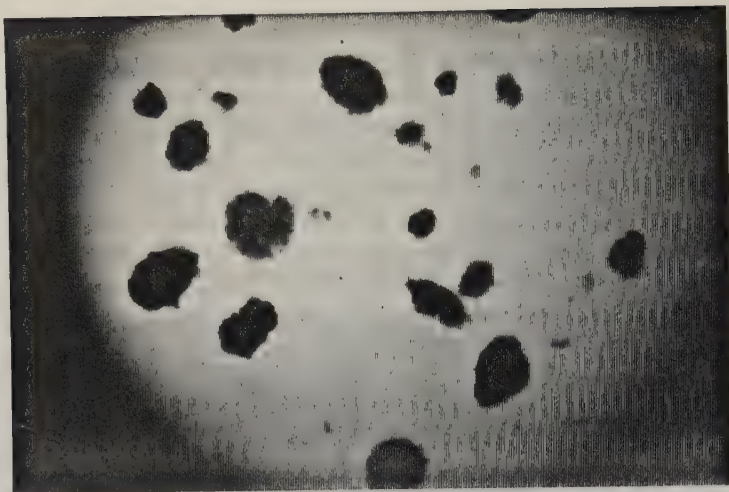


Abb. 8: Isolierte, neutralrotgefärbte Inseln im Durchlicht
(Vergrößerung ca. 50fach)

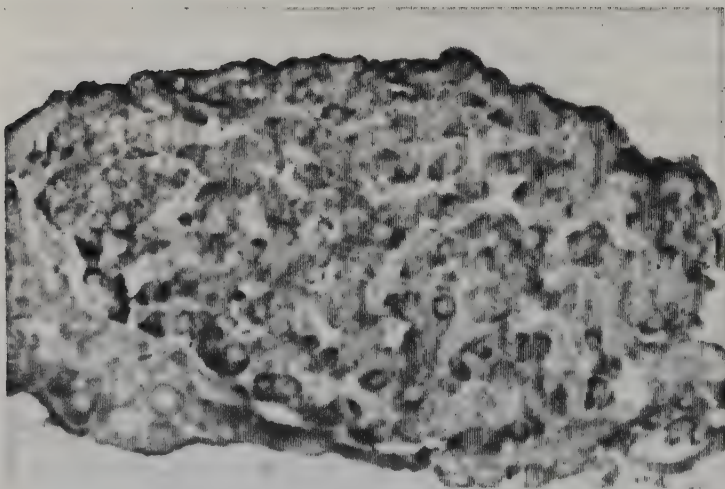


Abb. 9: isolierte Inseln: Anfärbung von Insulin mit Hilfe
der indirekten Immunperoxidase-methode, Gegenfärbung
Hämatoxylin (Vergrößerung ca. 450fach)

3.1.3.1 Immunhistologie

Hierzu wurden Inseln, wie in "Methoden" erwähnt, isoliert, wobei jedoch die Anfärbung der Inseln wie unter 3.1.1.2 beschrieben erfolgte.

Die isolierten Inseln wurden in Paraffin eingebettet und mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Methode (70) gegen Insulin gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin.

In der Abbildung 9 erkennt man eine Insel, umgeben von einer intakten Bindegewebskapsel mit u. a. zentral liegenden Betazellen, angefüllt mit zytoplasmatischen Insulingranula. Zeichen eines Zellhydrops oder einer Kernpyknose sind nicht erkennbar.

3.1.3.2 Insulin- und Proteingehalt

Hierzu wurden Inseln wie oben isoliert und Gruppen von je 5 sowohl zur Protein- (siehe 2.12) als auch Insulinbestimmung (siehe 2.10) entnommen. Die Ergebnisse von 5 Isolationen zeigt Tabelle 2.

Die Werte liegen in dem in verschiedenen Arbeiten (62, 64) angegebenen Rahmen.

3.1.3.3 Statische Inkubation isolierter Inseln

Als einfachstes Verfahren zur Beurteilung der Funktion der Inseln bietet sich die statische Inkubation an. Hierbei werden 10 Inseln i. a. jeweils eine Stunde erst einer sub-stimulatorischen (3 mM), dann einer maximal stimulierenden (20 mM) Glukosekonzentration ausgesetzt und die sezernierte Insulinmenge als Funktionsparameter gemessen. Um ein "Lacken" der Inselzellen als Ursache der Insulinfreisetzung auszuschließen, wird in einer dritten Phase wieder mit 3 mM Glukose inkubiert (siehe 2.8).

Protein	Insulin	Quotient
($\mu\text{G}/\text{Insel}$)	(ng/Insel)	Insulin/ Protein ($\text{ng}/\mu\text{g}$)
4,53 $\pm$ 0,19	43,3 $\pm$ 3,6	9,51 $\pm$ 0,381

Tab. 2: Protein- und Insulingehalt isolierter Inseln
(MW $\pm$ SEM)

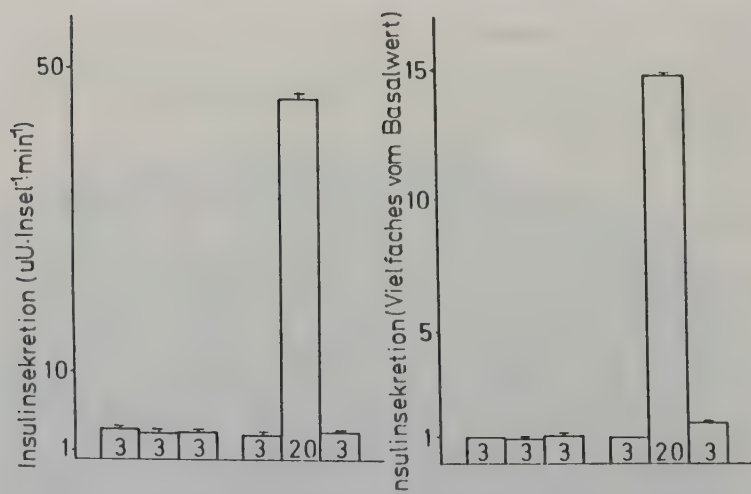


Abb. 10: statische Inkubation mit Glukose
a) absolut sezernierte Mengen
b) Sekretion bezogen auf Vorstimulationswert
(MW $\pm$ SEM, Werte aus 4 Versuchen)

Wie aus Abb. 10 ersichtlich, zeigen die isolierten Inseln eine gute Stimulierbarkeit und reagieren auch prompt auf den Wegfall des Stimulus.

3.1.3.4 Perifusion isolierter Inseln

Einen genaueren Einblick in die Funktion der Inseln bietet die Perifusion, die erstmals von Lacy (96) 1972 beschrieben wurde. Hierbei werden Inseln, die sich auf einem Filter befinden, von Puffer umströmt, der die zu testenden Stimulatoren oder Inhibitoren enthält.

Durch den kontinuierlichen Pufferfluß wird verhindert, daß eventuell vorhandener Substratverbrauch oder Rückkopplungen über sezernierte Substanzen ins Gewicht fallen.

Die Ergebnisse von 4 Perifusionen zeigt Abb. 11. Die Sekretion wurde hierbei auf die gesamte aus den Inseln extrahierbare Insulinmenge bezogen. Hierzu wurden die Filterblättchen nach der Perifusion vorsichtig aus dem Aufbau entnommen und dem in 2.10 beschriebenen Verfahren unterzogen.

Wie ersichtlich, zeigen die Inseln das in der Literatur (97) beschriebene, typische biphasische Sekretionsprofil. Dies kann als ein weiterer Hinweis auf die Integrität der Inseln gelten, da sich minimale Läsionen in einem Fehlen des ersten Anstiegs manifestieren würden, da dieser auf der Mobilisierung eines membranhaften Insulinpools beruht (97).

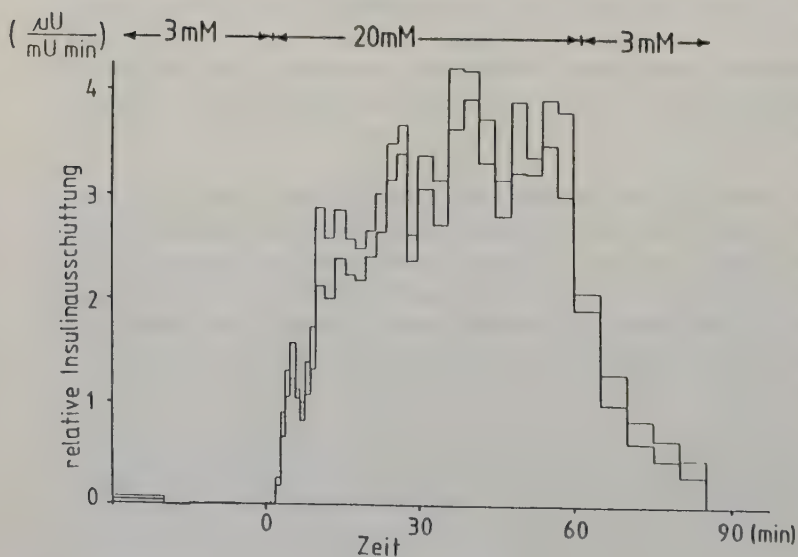
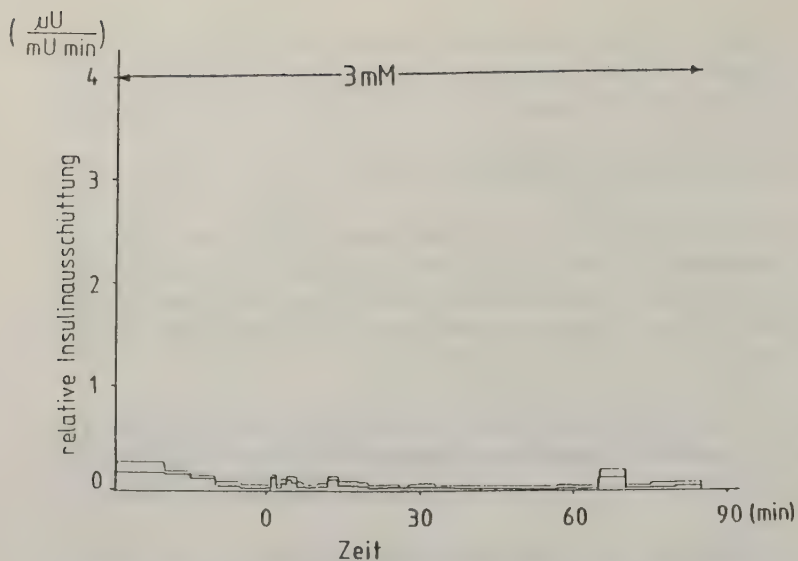
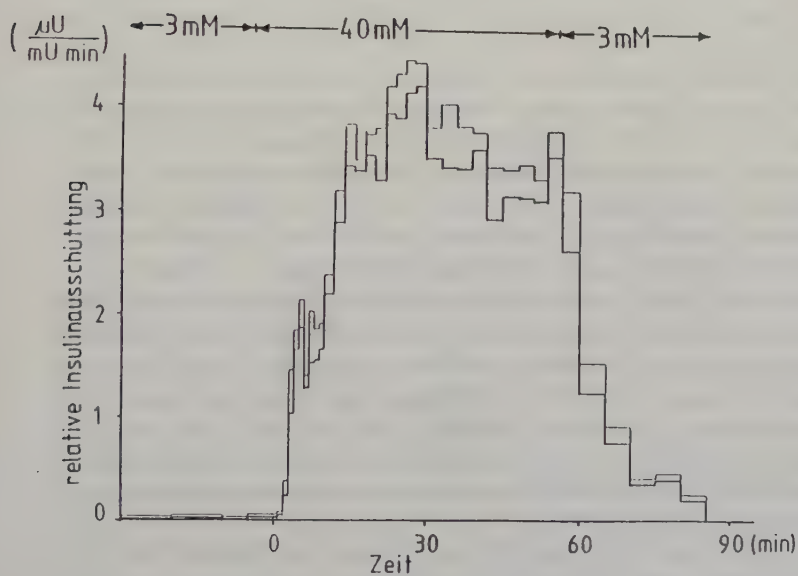
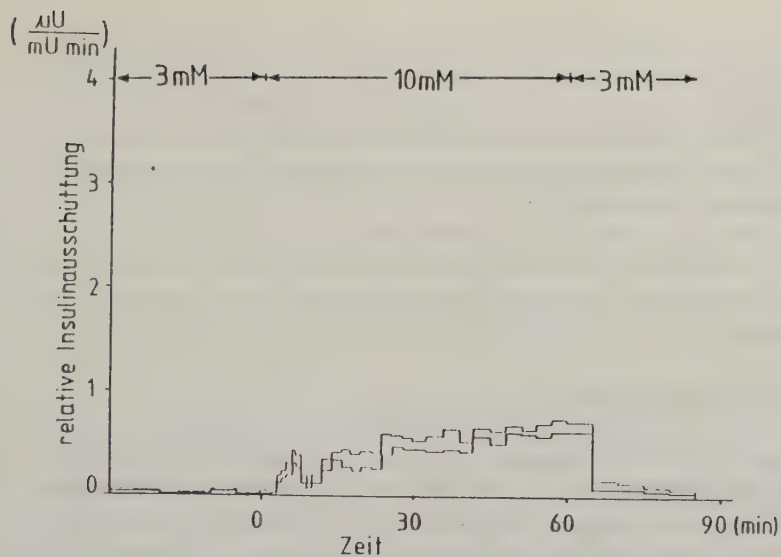


Abb. 11: Perifusion von je 50 frisch isolierten Inseln,
 Sekretion bezogen auf extrahierbares Insulin
 (MW $\pm$ SEM)
 Kontrolle (keine Stimulation)
 Stimulation mit 10 mM Glukose
 mit 20 mM
 mit 40 mM



3.2 Zelldissoziation

Das von Dyrberg (43) beschriebene Verfahren des Inselzell-oberflächenantikörperassays erfordert die Verwendung von intakten Inselzellen.

Es wurde also ein Verfahren zur Herstellung einer Inselzellsuspension gesucht, mit möglichst hoher Ausbeute und Reinheit.

3.2.1 Mechanische Dissoziation

Dyrberg (43) verwendete das von Lernmark (104, 108) beschriebene Verfahren. Hierbei werden isolierte Inseln in kalziumfreiem Medium mittels einer Pasteurpipette, deren Öffnung auf ca. 200 μm verengt wurde, durch die Scherkräfte, die beim Pipettieren entstehen, in Einzelzellen geteilt.

Da der Verzicht auf eine enzymatische Methode wünschenswert erschien, wurde zuerst versucht, dieses Verfahren nachzuvollziehen. Zu diesem Zweck wurden Inseln, wie unter "Methoden" beschrieben, isoliert, in 1 ml Zelldissoziationspuffer aufgenommen und in ein auf 25 °C temperiertes Wasserbad plaziert. Die Inseln wurden dreimal durch eine silikonisierte Pasteurpipette aspiriert, deren Öffnung durch Abflammen bis auf 200 μm verschlossen war. Die noch nicht dissoziierten Inseln wurden absedimentiert, der Überstand abgenommen und frischer Puffer hinzugefügt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis keine Inseln mehr sichtbar waren. Die gesammelten Überstände wurden zentrifugiert, das Sediment nach 2.1.3.4 mit Ethidiumbromid und Acridinorange gefärbt und die Suspension unter einem Epifluoreszenzmikroskop betrachtet.

Während die Ausbeute mit ca. 600 Zellen/Insel durchaus akzeptabel war, ließ der maximale Anteil lebender Zellen mit 30 % diese Methode als ungeeignet erscheinen. Auch der Versuch, durch Austausch der Pasteurpipette gegen Abbocath-katheter eine schonendere Bearbeitung zu erreichen, erwies sich als nicht erfolgreich.

Die Möglichkeit, allein durch mechanische Bearbeitung eine zufriedenstellende Einzelzellsuspension herzustellen, dürfte u. a. an den Inseln, einem von Labor zu Labor unterschiedlichem Ausgangsmaterial, liegen. Während die hier verwendete Kollagenase (Serva, Typ V) speziell in Hinblick auf niedrige tryptische Aktivität hergestellt wird, werden in der Literatur (z. B. 108) häufig Kollagenasepräparationen erwähnt (z. B. Worthington IV oder die Kollagenase der Fa. Boehringer), die einen höheren Anteil an tryptischen Begleitenzymen aufweisen und dadurch eventuell das Inselbindegewebe auflockern.

3.2.2 Zelldissoziation mit DNase

Charles (27) versuchte, durch Einbeziehung von DNase die mechanische Dissoziation zu erleichtern.

Nach seiner Beschreibung wurden isolierte Inseln in 500 μ l Zelldissoziationspuffer aufgenommen, der 200 μ g/ml DNase enthielt. Diese Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, nach jeweils 10 min eine Probe entnommen und mit Acridinorange und Ethidiumbromid (siehe 2.1.3.4) gefärbt. Nach 30 Minuten wurden die Inseln dreimal durch einen 22 gauge-Abbocath aspiriert. Hierbei zeigte sich jedoch von Anfang an ein Anteil von ca. 40 % toter Zellen. Eine Verringerung der DNasekonzentration auf 50 μ g/ml brachte keine nennenswerten Fortschritte. Auch konnten hiermit nicht alle Inseln in Einzelzellen dissoziiert werden.

3.2.3 Zelldissoziation mit DNase und Trypsin

Eine weitere Methode zur Gewinnung von Einzelzellen aus Inseln wurde von Pipeleers (146) publiziert. Hierbei werden Inseln in kalziumfreiem Medium mit DNase und Trypsin vorsichtig mechanisch bearbeitet, wobei die Konzentrationen sowohl von DNase als auch Trypsin um Faktor 50 - 100 geringer sind als bei anderen veröffentlichten Verfahren (siehe Übersicht bei 144).

Zur Testung dieses Verfahrens wurden isolierte Inseln in Zelldissoziationspuffer gewaschen und 12 min bei 30 °C im gleichen Puffer, der jedoch zusätzlich 2 µg/ml DNase und 10 ppm Trypsin enthielt, inkubiert. Die Inselsuspension wurde während der Inkubation aspiriert und anschließend durch ein 63 µm-Nylonfiltertuch gesiebt, welches mit 10 ml Puffer gespült wurde.

Die erhaltene Suspension wurde zweimal gewaschen und die Zellen nach 2.1.3.4 mit Ethidiumbromid und Acridinorange gefärbt.

Die Ausbeute mit dieser Methode betrug etwa 100.000 Zellen/Tier und der Anteil toter Zellen überstieg nie 10 %.

Da jedoch die Ausbeute starken Schwankungen unterworfen war (Bereich 50.000 - 150.000 Zellen/Tier) wurde nach Möglichkeiten der Modifikation gesucht. Hierbei hat es sich bewährt, den Zelldissoziationspuffer erst auf die geforderte Inkubationstemperatur zu bringen und dann die benötigten Enzyme als konzentrierte Stammlösung zuzugeben. Hierdurch wird eine eventuelle Selbstverdauung der Enzyme während der Erwärmungsphase vermieden. Die Filtration konnte durch Verwendung von Miliporefiltern (# SX0001310) vereinfacht werden. Dies führte zu dem in "Methoden" (siehe 2.5) beschriebenen Verfahren.

Abb. 12 zeigt eine typische Zellpräparation. Zu beachten sind der geringe Anteil an toten, d. h. rotgefärbten Zellen und die kleine Zahl von größeren Zellgruppen. Abb. 13 zeigt das durch den Nylonfilter zurückgehaltene unverdaute Gewebe, hier eine Kapillare und eine unverdaute Insel sowie einige Einzelzellen.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse aller Versuche wiedergegeben, bei denen Zellen nach dem in "Methoden" (siehe 2.5) beschriebenen Verfahren gewonnen wurden.

Abb. 12:



Abb. 13:

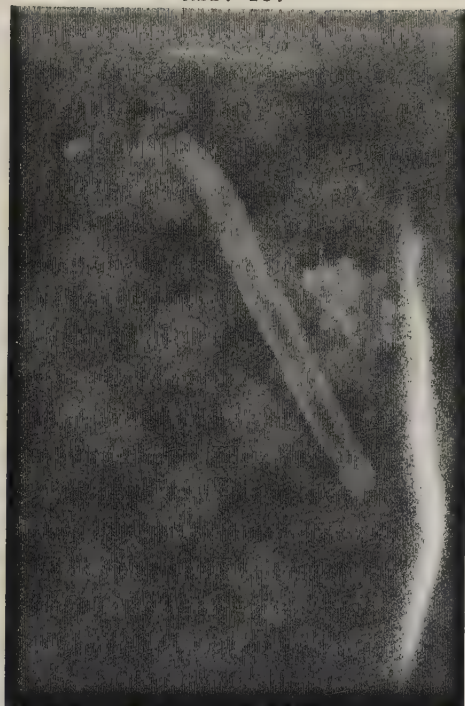


Abb. 12: Isolierte Inselzellen nach Anfärbung mit Acridinorange und Ethidiumbromid. Sichtbarmachung durch Epifluoreszenz (Vergrößerung ca. 40fach)

Abb. 13: Durch Nylonfilter zurückgehaltenes unverdautes Gewebe (Ethidiumbromid-Acridinorange, Vergrößerung ca. 150fach)

Zellenausbeute

Inseln/Tier	170,3 $\pm$ 14,8 (n=35)
Zellen/Tier	1,647 $\cdot 10^6$ $\pm$ 0,116 $\cdot 10^6$ (n=50)
Zellen/Insel	859 $\pm$ 40 (n=35)

Korrelation Ausbeute/Anzahl Tiere: $r = 0,44335$ ($p < 0,001$)

Korrelation Ausbeute/Anzahl Inseln: $r = 0,88436$ ($p < 0,001$)

Tab. 3: Durchschnittlich erzielte Ausbeuten bei der Inselisolation und Einzelzellpräparation

3.3 Inselzelloberflächenantikörperassay

3.3.1 Charakterisierung der Versuchsseren

Während der Aufstellung des Assays wurden Seren folgender Patienten verwendet:

L: 26 Jahre, männlich, gesund, kein Diabetes bei Verwandten 1. Grades (weder Typ 1 noch Typ 2)

K: 24 Jahre, weiblich, gesund, kein Diabetes bei Verwandten 1. Grades (weder Typ 1 noch Typ 2)

H: 27 Jahre, männlich, Zustand nach Mononucleosis infectiosa, Vater Typ-1-Diabetes

F: 17 Jahre, männlich, Typ-1-Diabetes, eine Woche nach Diagnose

D: 15 Jahre, männlich, Typ-1-Diabetes, seit 1 Woche klinisch manifest

S: 25 Jahre, weiblich, Typ-1-Diabetes, 2 Wochen klinisch manifest

A: 14 Jahre, weiblich, frisch manifester Typ-1-Diabetes

R4: Hasenserum (freundlicherweise von Dr. Åke Lernmark, Nordisk-Forschungslaboratorium, Gentofte, überlassen). Der Hase wurde durch wiederholte intrapopliteale Injektion von Ratteninselzellen immunisiert (41).

NI: entsprechendes Hasennormalserum

Die Seren wurden hitzeinaktiviert und portioniert bei - 20 °C gelagert, um einen durch wiederholtes Auftauen bedingten möglichen Aktivitätsverlust der Immunglobuline zu vermeiden.

3.3.2 Unspezifische Bindung von Immunglobulinen an Oberflächen

Da bekannt ist, daß die Bindung von Immunglobulinen, und damit des radioaktiv markierten Protein A, an Oberflächen üblicher Reagenzgefäße beträchtlich sein kann, sich andererseits aber die Bindung von Protein A über Immunglobuline nach Literaturangaben (74, 41) im Bereich von 1 - 2 % der eingesetzten Radioaktivität bewegt, wurde diesem Punkt besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

In einem Vorversuch wurden übliche Reagenzgefäße (siehe Abb. 14) mit 100 μ l Serum (1 : 50 verdünnt) eine Stunde bei 4 °C inkubiert, die Röhrchen mit je 1 ml HNB-Puffer gewaschen und anschließend mit 50 μ l 125 J-Protein A (1 : 100 verdünnt) inkubiert. Die nach nochmaligem Waschen in den Röhrchen verbliebene Radioaktivität wurde gemessen und in % der eingesetzten Aktivität ausgedrückt.

Wie aus der Abbildung 14 zu entnehmen ist, beträgt der durch unspezifische Adsorption von Serumproteinen gebundene Anteil ca. 40 % mit erheblichen interindividuellen Schwankungen. Es wurde daher nach einer Methode gesucht, diese unspezifische Bindung beträchtlich zu verringern.

3.3.2.1 Einfluß von Albumin

Durch Einbeziehung von Albumin in den Inkubationspuffer oder durch Vorbehandlung der Reaktionsgefäße mit albuminhaltigen Lösungen wurde versucht, die unspezifische Bindung von Globulinen und damit von Protein A zu verringern.

Zur Darstellung dieses Effekts wurden 2,4 ml-Polypropylengefäße (Greiner # 623201) und 5 ml-Polystyrolröhrchen 15 min bei Raumtemperatur mit Albuminlösung (30 g/l) inkubiert. Die Lösung wurde abdekantiert, in jedes Röhrchen wurden je 100 μ l eines 1:50 verdünnten Serums bzw. Puffers inkubiert und der Inhalt abdekantiert. Hierauf wurden 50 μ l Protein A-Tracer zugegeben und eine halbe Stunde bei 4 °C inkubiert.

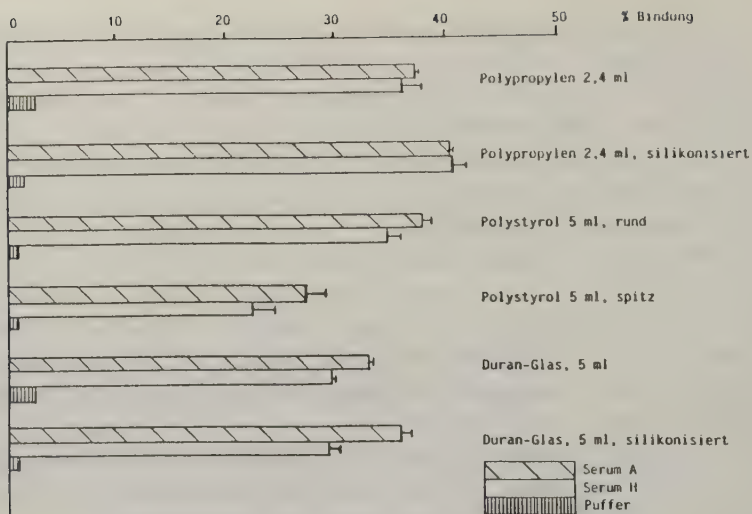


Abb. 14: Unspezifische Bindung von Serumproteinen an Oberflächen üblicher Reagenzgefäße (Versuchsbedingungen siehe Text, Dreifachwerte, MW $\pm$ SEM)

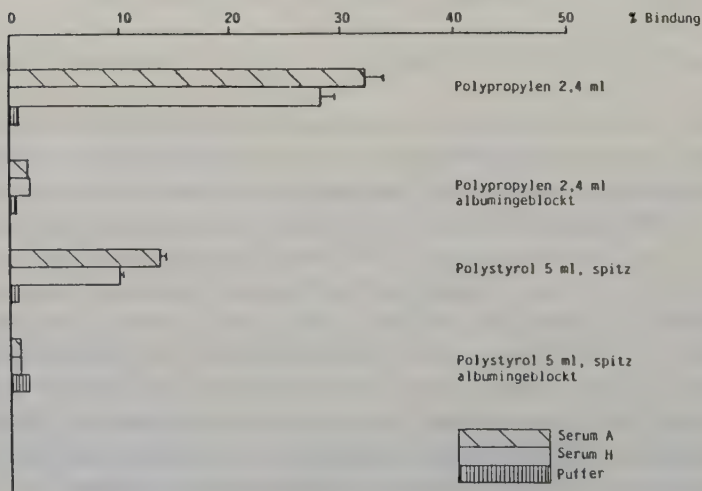


Abb. 15: Einfluß der Albuminvorbehandlung auf die unspezifische Bindung von Protein-A-Tracer (Dreifachbestimmungen, Versuchsbedingungen siehe Text, MW $\pm$ SEM)

Das Ergebnis zeigt Abb. 15. Hier kommt deutlich zu Ausdruck, daß sich durch die Vorbehandlung mit Albuminlösung die unspezifische Bindung um etwa Faktor 10 vermindern läßt.

3.3.2.2 Einfluß unterschiedlicher Reaktionsgefäße auf die Leerbindung

Hier sollten 2 Röhrchen untersucht werden, die verschiedene Vorteile versprechen.

1. "Minisorb"-Röhrchen der Fa. Nunc, die lt. Hersteller speziell in Hinblick auf niedrige unspezifische Bindung von Gammaglobulinen hergestellt werden und daher in der Literatur Verwendung fanden (41).
2. "Mikro-RIA-Röhrchen" (Sarstedt # 73.1055), die vor allem praktische Vorteile in Hinblick auf Temperierbarkeit und Unkompliziertheit beim Waschen des Sediments bieten sollen.

Diese zwei Reaktionsgefäßsorten wurden mit je 100 µl der Seren A, F L und H (siehe 3.3.1, jeweils 1 : 10 verdünnt) eine Stunde bei 4 °C inkubiert, je dreimal mit HNB-Puffer gewaschen und anschließend 30 Minuten mit ^{125}J -Protein A (1 : 100 verdünnt) inkubiert. Die nach dreimaligem Waschen verbliebene Radioaktivität wurde in % der eingesetzten Totalaktivität ausgedrückt.

Wie aus der Abbildung 16 ersichtlich, ließ sich bei den "Minisorb"-Röhrchen durch Behandlung mit Albumin keine weitere Verbesserung erreichen. Dagegen sank die unspezifische Bindung der "Mikro-RIA-Röhrchen" durch Vorinkubation auf Werte ab, die denen der "Minisorb"-Röhrchen entsprachen. Beide Röhrchensorten zeigten jedoch im Vergleich zu Standardsorten (vgl. Abb. 14 und 15) um Faktor 10 geringere unspezifische Bindungen.

Wegen der praktischen Vorteile des "Mikro-RIA-Systems" (Temperierständer, Röhrchen, Absaugkamm) fiel die Wahl für die weiteren Versuche auf die "Mikro-RIA-Röhrchen".

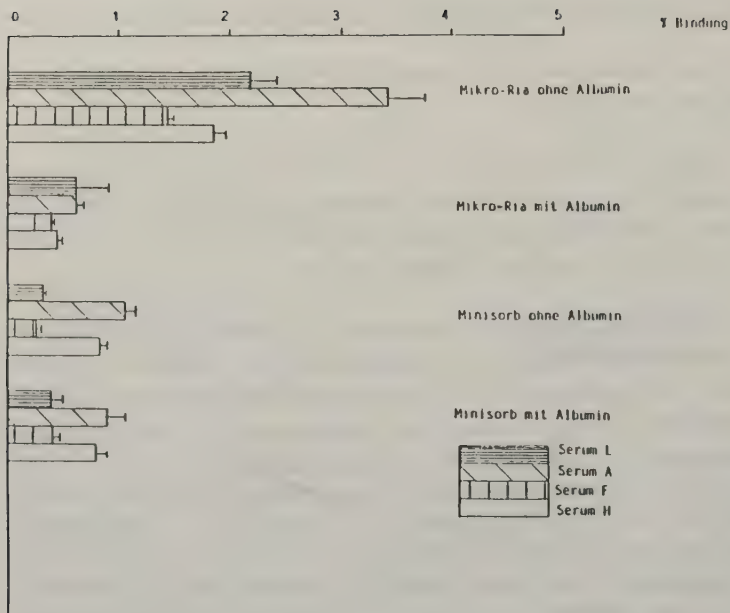


Abb. 16: Unspezifische Bindung von Protein-A-Tracer an speziell für Radioligandenassay hergestellten Röhrchen (Dreifachwerte, MW $\pm$ SEM, Assaybedingungen siehe Text)

3.3.2.3. Zusammenhang zwischen unspezifischer Bindung und Serumproteinfraktion

Zur Untersuchung der Frage, durch welche der Serumsfraktionen die unspezifische Bindung von Protein A an der Oberfläche der Reaktionsgefäße verursacht wird, wurden Seren von 8 Normalpersonen beiderlei Geschlechts (Alter 22 - 31 Jahre, Mittelwert 26,1 Jahre) sowie die Seren H, L und D untersucht (siehe 3.3.1).

Zur Bestimmung der Serumfraktionen wurden in einer Routine-Elektrophorese die relativen Anteile bestimmt, das Gesamteiweiß wurde nach 2.12 mit Precinorm^R (Boehringer) als Standard ermittelt und hieraus die absoluten Mengen der Proteine errechnet. Die unspezifische Bindung wurde in "Mikro-Ria-Röhrchen" bestimmt, die mit einer Albuminlösung (30 g/l) 1 Stunde bei 4 °C geblockt worden waren. Die Seren wurden 1:10 verdünnt, 1 Stunde bei 4 °C inkubiert, die Röhrchen dreimal mit HNB-Puffer gewaschen, mit Protein A-Tracer in der Verdünnung 1:50 dreißig Minuten bei 4 °C inkubiert, wiederum dreimal gewaschen und die verbliebene Radioaktivität gezählt. Die absoluten Mengen bzw. relativen Anteile der Serumfraktionen wurden mit den entsprechenden Leerbindungen in Korrelation gebracht.

	relativ	absolut
Albumin	-0,5089	0,00721
Alpha-1-Globuline	0,30769	0,41308
Alpha-2-Globuline	0,15424	0,29010
Beta-Globuline	-0,06336	0,22045
Gamma-Globuline	0,65478*	0,76910**
Quotient Albumin/Globulin	-0,52435	

Tab. 4: Zusammenhang zwischen Serumfraktionen und unspezifischer Bindung bei 12 Normalpersonen (Versuchsbedingungen siehe Text: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$)

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4. Aus ihr kann ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Leerbindung und absoluter Gammaglobulinmenge ($p < 0,01$) sowie zwischen Leerbindung und relativem Gammaglobulinanteil ($p < 0,05$) festgestellt werden. Die interindividuellen Unterschiede der Leerbindungen dürften daher auf dem unterschiedlichen Immunglobulingehalt der verschiedenen Seren beruhen.

3.3.2.4 Zusammenhang zwischen unspezifischer Bindung und pH-Wert, Albumingehalt, Osmolarität und Temperatur der Blocklösung

Zur Untersuchung dieser Frage wurden 3 verschiedene Blocklösungen hergestellt. Lösung 1 enthielt 3 g% Albumin sowie 10 mM Hepes. Lösung 2 war eine doppelt konzentrierte Lösung 1, d. h. 6 g% Albumin sowie 20 mM Hepes. Lösung 3 war wie Lösung 1, zur Erhöhung der Osmolarität enthielt sie jedoch zusätzlich 40 mM NaCl.

Die Lösungen wurden mit NaOH bzw. HCl auf den jeweiligen pH eingestellt und die "Mikro-RIA-Röhrchen" wurden jeweils 1 Stunde bei 4 bzw. 25 °C mit den betreffenden Lösungen inkubiert. Die so vorbehandelten Röhrchen wurden 1 Stunde mit demjenigen Normalserum (1:10 verdünnt) inkubiert, das im Vorversuch (siehe 3.3.2.3) die höchste unspezifische Bindung gezeigt hatte. Die Röhrchen wurden gewaschen und eine halbe Stunde mit Protein A-Tracer in der Verdünnung 1:50 inkubiert. Die verbliebene Radioaktivität wurde nach dreimaligem Waschen bestimmt.

Die Ergebnisse für 4 Grad zeigt Abb. 17 a, diejenigen für 25 °C sind aus Abb. 17 b ersichtlich. Aus beiden geht hervor, daß Lösung 2 bei allen pH-Werten sowie bei beiden untersuchten Temperaturen die geringste Leerbindung zeigt. Ebenso zeigte sich die Inkubation bei 25 °C bei allen Lösungen und pH-Werten derjenigen bei 4 °C überlegen. Zwar bietet das Blocken mit sauren Proteinlösungen Vorteile, da jedoch der Assay selbst bei pH 7,4 abläuft, wurde als endgültige Lösung das in "Methoden" (siehe 2.1.3.8) beschriebene Verfahren gewählt.

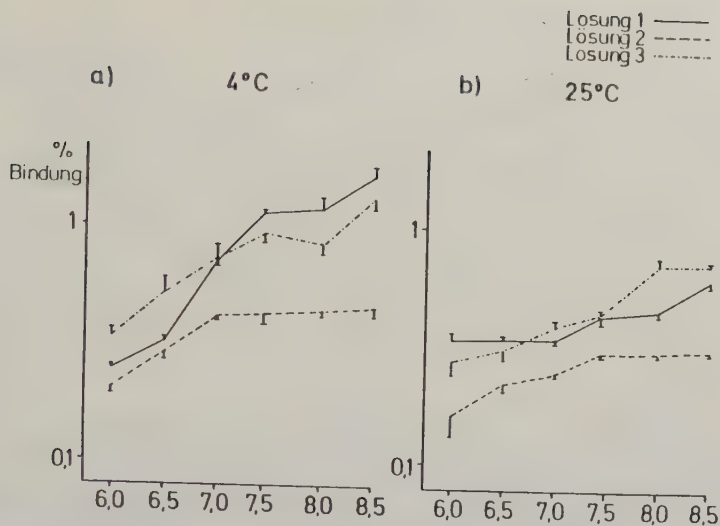


Abb. 17: Einfluß von pH-Wert und Konzentration der Blocklösung auf die unspezifische Bindung
a) bei 4 °C b) bei 25 °C (Versuchsbedingungen siehe Text, Dreifachwerte, MW +/- SEM)

Durch die in 3.3.2.1 - 3.3.2.4 dargestellten Versuche konnte die Leerbindung von Werten um 40 % (Abb. 14) auf Werte um 0,4 % (Abb. 17) reduziert werden.

Da jedoch, wie aus Abb. 16 ersichtlich, weiterhin interindividuelle Unterschiede in der unspezifischen Bindung bestehen, die auf den unterschiedlichen Gammaglobulingehalt der Seren zurückzuführen sein dürften (siehe 3.3.2.3), wurden beim endgültigen Verfahren (siehe 2.7) die entsprechenden Leerbindungen mitbestimmt und in Abzug gebracht.

3.3.3 Inkubationszeit mit Protein A-Tracer

Aus der Literatur (99) ist bekannt, daß die Bindung von Protein A an Immunglobuline zwar schnell (ca. 10 min.) geschieht, jedoch kann bei Überschuß an IgG eine Dissoziation der entstandenen Komplexe auftreten. Zur Auffindung des Zeitpunkts, bei dem maximale Bindung des Tracers auftritt, ohne daß die Dissoziation schon begonnen hat, wurden drei verschiedene Seren, wie in "Methoden" (siehe 2.7) beschrieben, inkubiert, die Röhrchen gewaschen und mit Tracer (1:50 verdünnt) jeweils 15, 30, 45 und 60 Minuten inkubiert.

Aus Abb. 18 sind die spezifischen Bindungen ersichtlich. Es wird deutlich, daß der Unterschied zwischen Normalserum und pathologischem Serum nach 30 Minuten am größten ist, während bei längeren Inkubationszeiten bei allen Seren die spezifische Bindung abnimmt.

3.3.4 Abhängigkeit der spezifischen Bindung von der Konservierungs-

Da die Angaben über die maximale Verwendbarkeit fixierter Inseln in der Literatur unterschiedlich sind und zwischen 2 (44) und 7 (74) Wochen schwanken, wurden eigene Versuche zu diesem Problem unternommen.

Dabei wurden Inselzellen isoliert (siehe "Methoden"), fixiert und die erhaltene Menge in 4 Portionen aufgeteilt. Als Testseren dienten die Seren D, H und L (siehe 3.3.1). Diese Seren wurden am Fixierungstag (= Tag 0) sowie am Tag 3, 7 und 14 getestet.

Wie aus Abb. 19 ersichtlich, zeigte sich schon am Tag 7 ein Bindungsverlust, der sich am Tag 14 noch weiter verstärkt hatte. Aus diesem Grunde wurden die fixierten Zellen bis maximal zum 4. Tag verwendet.

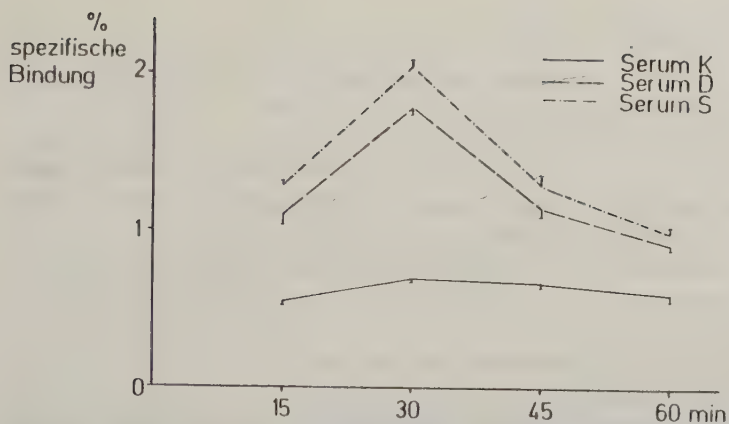


Abb. 18: Abhängigkeit der spezifischen Bindung von Protein A von der Inkubationszeit (Dreifachwerte, MW $\pm$ SEM)

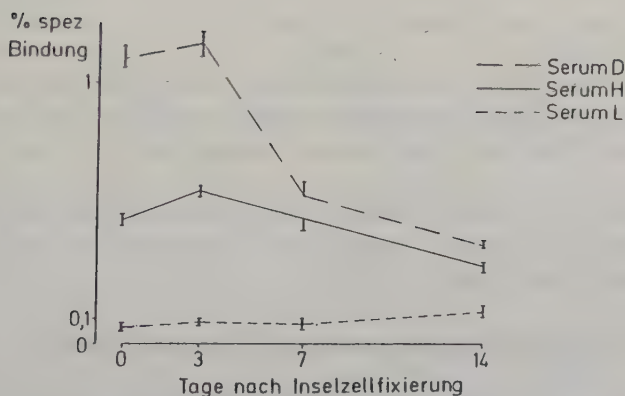


Abb. 19: Abhängigkeit der spezifischen Bindung der Seren D, H und L von der Zeit nach Fixation der isolierten Inselzellen (jeweils Dreifachwerte, MW $\pm$ SEM)

3.3.5 Spezifität

Als indirekte Hinweise für die Spezifität eines Radioliganden Assays können gelten:

1. eine positive Korrelation zwischen Bindung und Antigenmenge, d. h. in diesem Falle Zellzahl, innerhalb eines bestimmten Bereiches.
2. eine positive Korrelation zwischen Bindung und Antikörpermenge

als direktere Hinweise können gelten:

3. eine stark positive Reaktion mit Seren von Tieren, die gegen das betreffende Antigen, in diesem Falle intakte Inselzellen, immunisiert wurden (siehe 3.3.1).
4. Die positive Reaktion von Seren sollte durch Adsorption mit dem betreffenden Antigen vermindert werden. Dieser Effekt müßte sich auch an Hyperimmunseren (s. o.) zeigen lassen.

3.3.5.1 Korrelation zwischen Zellzahl und Bindung

Inselzellen wurden isoliert und fixiert. Als Testseren dienten die Seren L und H (siehe 3.3.1), die in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt wurden. Diese Seren wurden zusammen mit einer ansteigenden Anzahl fixierter Inselzellen inkubiert und die spezifische Bindung nach 2.7 bestimmt.

Wie Abb. 20 zeigt, besteht für beide Seren eine positive Korrelation zwischen Bindung von Protein A und Zellzahl, die statistisch signifikant ist.

3.3.5.2 Abhängigkeit der Bindung von der Antikörpermenge

Wieder wurden, wie in "Methoden" beschrieben, fixierte Inselzellen gewonnen und die Seren A, D und L (siehe 3.3.1) im Assay (siehe 2.7) in den Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:1000 eingesetzt.

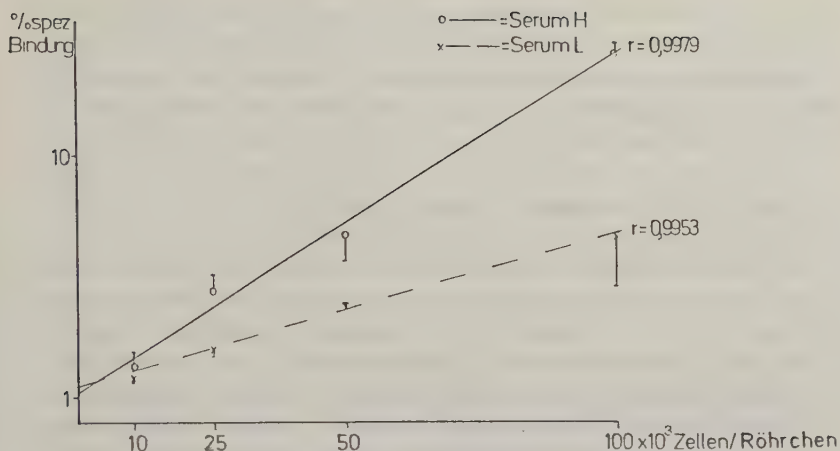


Abb. 20: Abhängigkeit der spezifischen Bindung der Seren H und L von der Zellzahl in einem Assay (Dreifachwerte, MW $\pm$ SEM)

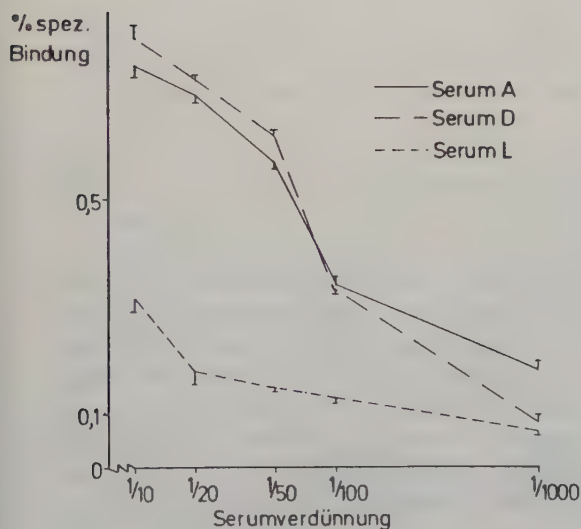


Abb. 21: Zusammenhang zwischen Serumtiter und spezifischer Bindung an Inselzellen (Dreifachwerte, MW $\pm$ SEM)

Wie aus Abb. 21 ersichtlich, zeigten die Seren A und D, die im Normalassay durchgehend höhere Werte erbracht hatten, gegenüber dem Normalserum L erhöhte Bindungen, wobei dies beim Serum A selbst in der höchsten Verdünnung der Fall war. Es zeigte sich jedoch bei allen drei Seren eine Abhängigkeit von der Antikörpermenge.

3.3.5.3 Bindung von Seren immunisierter Tiere

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität wurden Hasenserum, (das in 3.3.1 beschriebene Hyperimmunserum sowie ein Normalserum) in vier Assays in der Verdünnung 1 : 1000 untersucht (wie in "Methoden unter 2.7 ausgeführt). Die spezifische Bindung des Hyperimmunserums R4 wurde wegen der Interassayvariabilität als Bezugspunkt gewählt und die Bindung des Normalserums als prozentualer Anteil hiervon errechnet.

Es kommt aus Abb. 22 klar zum Ausdruck, daß selbst in dieser hohen Verdünnung ein Unterschied zwischen Hyperimmunserum und Normalserum besteht.

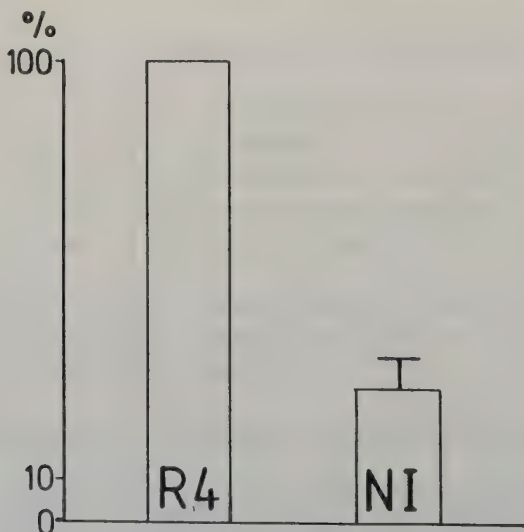


Abb. 22: Spezifische Bindung von Hyperimmunhasenserum R4 und entsprechendem Normalserum NI in vier Assays (jeweils in Dreifachwerten, Assaybedingungen siehe Text)

3.3.5.4 Adsorptionsversuche mit Inselzellen

Zum Zwecke der Adsorption wurden Inselzellen frisch isoliert und die erforderlichen Zellkonzentrationen durch Verdünnen mit HNB-Puffer hergestellt. Hierbei wurden Zellen jeweils einer Präparation benutzt. Unverdünnte Seren (Human A, L und H) bzw. 1:100 verdünnte Seren (Hasen R4 und NI) wurden 1:1 mit der entsprechenden Suspension gemischt und 18 Stunden bei 4 °C auf einem Schütteltisch unter konstanter Bewegung inkubiert. Um eine unspezifische Beeinflussung der Bindung durch die Lagerung bei 4 °C auszuschließen, diente als Nullwert, d. h. Bindung des nicht adsorbierten Serums, eine Probe, die an Stelle der Zellsuspension die entsprechende Menge Puffer enthielt. Die Seren wurden nach der Adsorption durch Zentrifugation (2 min/8000 g) von den Zellen getrennt und 1:5 weiterverdünnt, so daß sich die üblichen Assayverdünnungen von 1:10 (bei Humansen) bzw. 1:1000 (bei Hasensen) ergaben. Diese adsorbierten Seren wurden dann im Assay, wie in 2.7 beschrieben, eingesetzt.

Abb. 23 zeigt die Ergebnisse zweier Adsorptionen von Humanseren. Wegen der Interassayvariabilität (siehe 3.3.8.2) wurden die Bindung des nicht adsorbierten Serums gleich 100 % gesetzt und die Bindungen der adsorbierten Seren als ihr relativer Anteil ausgedrückt.

Abb. 24 zeigt das Ergebnis eines entsprechenden Versuchs mit den Hasensen R4 und NI.

Aus den Abbildungen erkennt man, daß sich sowohl die Bindungen derjenigen Humansen, die im Normalassay erhöhte Werte ergaben, als auch die Bindung des Hasenhyperimmunsers R4 durch Adsorption mit Inselzellen vermindern läßt, ohne jedoch Werte von Nicht-Immunsen zu erreichen. Die Untersuchung der Frage, ob eine weitere Verminderung bei der Adsorption mit noch höheren Inselzellzahlen zu erwarten wäre, scheiterte jedoch an der in einer Präparation maximal erhältlichen Zellzahl.

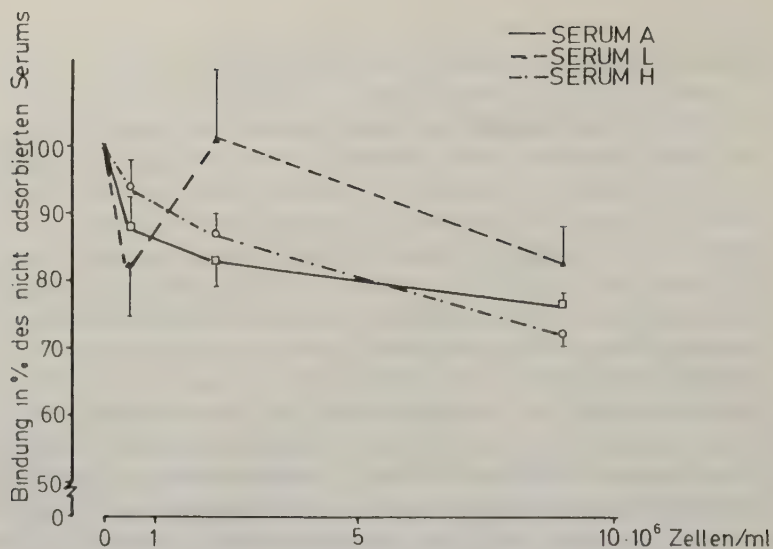


Abb. 23: Adsorption von Humanseren mit einer steigenden Zahl Inselzellen gemessen mit Protein- A-Radioliganden assay (Berechnung siehe Text, MW $\pm$ SEM aus 2 Adsorptionen)

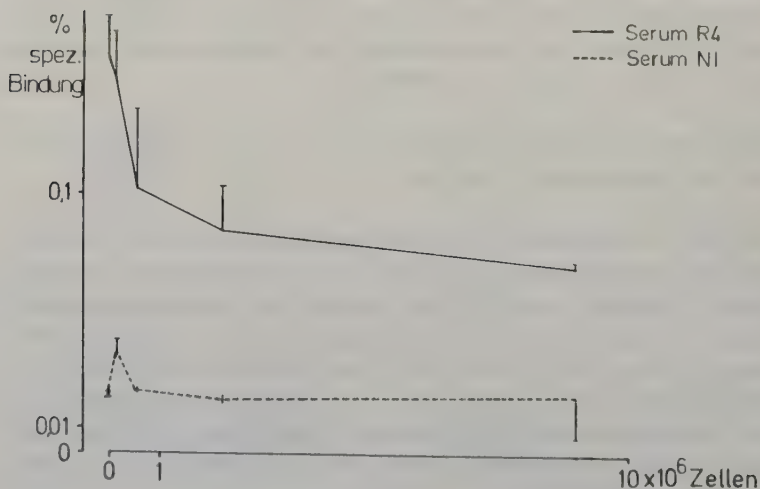


Abb. 24: Adsorption von Hasenserum mit Inselzellen (Testbedingungen siehe Text, Dreifachwerte, MW $\pm$ SEM)

3.3.6 Beeinflussung des Assays durch Pharmaka

Da der Protein A - "Cell Surface Antibody Assay" zur Verlaufsbeobachtung der Immuntherapie bei neu manifester Diabetes und bei immunsupprimierten Pankreastransplantierten eingesetzt werden soll, wurde der Einfluß der häufig zur Immunsuppression verwendeten Medikamente Methylprednisolon (Solu-Decortin^R), Azathioprin (Imurek^R) und Cyclosporin A (Sandimmun^R) auf den Assay getestet.

Als Testseren dienten die Seren L und D (siehe 3.3.1). Durch Verdünnen der entsprechenden Stammlösung mit dem entsprechenden Serum wurden folgende Serumkonzentrationen hergestellt:

Methylprednisolon:	100, 200, 500 µg/ml
Azathioprin:	100, 500 µg/ml
Cyclosporin A:	100, 500, 2000 ng/ml

Diese Seren wurden 1:10 mit HNB-Puffer verdünnt und im Assay nach 2.7 eingesetzt.

Die Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse. Während sich weder bei Azathioprin noch bei Methylprednisolon eine eindeutige Tendenz erkennen läßt, zeigte sich sowohl bei Serum L als auch bei Serum D bei Cyclosporin A in der höchsten Konzentration eine Verminderung der spezifischen Bindung. Diese Konzentration beträgt jedoch das 10fache der therapeutisch angestrebten Konzentration, dürfte also in praxi kaum vorkommen.

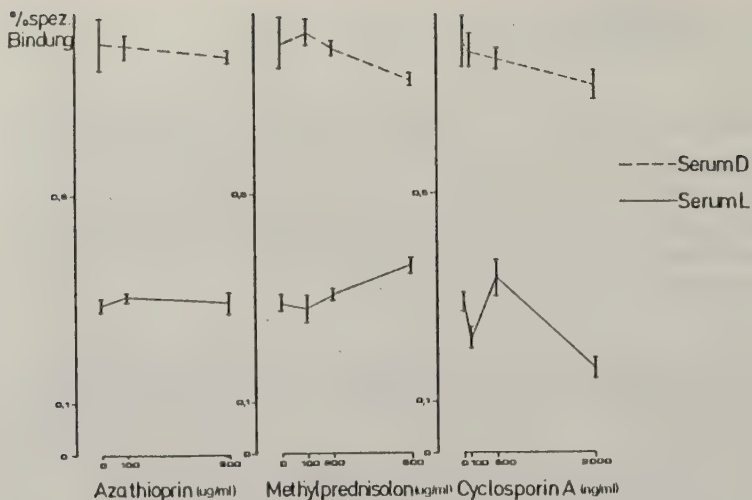


Abb. 25: Einfluß dreier zu Immunsuppression verwendeter Medikamente auf den IC₅₀-Assay (Dreifachwerte, MW $\pm$ SEM)

3.3.7 Intra- und Interassayvariabilität

Die Intra- und Interassayvariabilität stellen beim nichtkompetitiven Radioligandenassay eine besondere Problematik dar, da Antigen-, Antikörper- und Tracermenge direkt linear in das Ergebnis eingehen.

3.3.7.1 Intraassayvariabilität

Aus 4 Assays mit 111 Patientenproben (in Dreifachwerten) wurde die Intraassayvariabilität für jede Probe bestimmt. Sie betrug durchschnittlich $5,68 \pm 0,46 \%$ (MW $\pm$ SEM).

3.3.7.2 Interassayvariabilität

Schon während der Vorversuche fiel die bemerkenswerte und in der Literatur erwähnte (74) Interassayvariabilität auf. So betrug z. B. die spezifische Bindung des Serums L 1,005 $\pm$ 0,189 % (n = 27, Bereich 0,067 - 4,37), die des Serums H 1,954 $\pm$ 0,339 % (n = 24, Bereich 0,376 - 7,05), die des Serums D 1,414 $\pm$ 0,242 % (n = 14, Bereich 0,387 - 3,043) und die des Serums A 2,012 $\pm$ 0,421 % (n = 9, Bereich 0,735 - 4,05). Dabei zeigte sich jedoch innerhalb eines Assays eine konstante Reihenfolge, d. h. Serum L ergab jeweils die geringste, Serum H die höchste Bindung, während die Bindungen der Seren A und D zwischen diesen 3 Extremen lagen.

Zur Verifizierung wurden die Bindungswerte der Seren H (aus 24 Assays), D (aus 14 Assays) und A (aus 9 Assays) mit den entsprechenden Bindungswerten des Serums L, welches als Normalserum gelten kann und jeweils im gleichen Assay bestimmt worden war, korreliert.

Die Ergebnisse sind in Abb. 26 dargestellt. Für alle 3 Seren ergibt sich eine statistisch signifikante Korrelation zur Bindung des Normalserums L. Dies führte zum Versuch einer Standardisierung mit Hilfe von Kontrollseren (siehe 3.3.7.3).

3.3.7.2.1 Direktvergleich zweier Präparationen

Zur Untersuchung der Ursachen der Interassayvariabilität wurden als erstes 2 verschiedene Zellpräparationen in jeweils 3 verschiedenen Zellkonzentrationen im gleichen Assay mit den Seren H und L verglichen und die jeweils resultierende Korrelationsgerade Bindung versus Zellzahl errechnet.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, zeigte sich zwar für die beiden Seren in beiden Assays eine positive und statistisch signifikante Korrelation zwischen Bindung und Zellzahl, jedoch ergaben sich sowohl für Steilheit als auch für den y-Achsenabschnitt unterschiedliche Werte. Hieraus wurde der

Schluß gezogen, daß die Antigenmenge bezogen auf die Zellzahl nicht konstant ist.

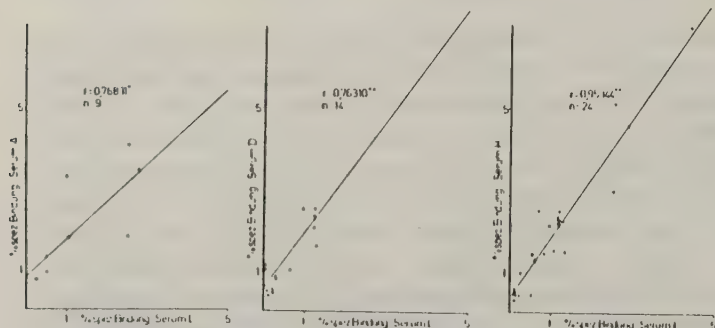


Abb. 26: Korrelationen der spezifischen Bindungen von Protein A der Seren H, D und A mit der spezifischen Bindung des Serums L (* = $p < 0,01$, ** = $p < 0,001$)

	Präparation 1	Präparation 2
Serum L	$a = 1,3 \times 10^{-5}$ $b = 0,056$ $r = 0,99902^{***}$	$a = 5 \times 10^{-6}$ $b = 0,061$ $r = 0,99065^{***}$
Serum H	$a = 2,36 \times 10^{-5}$ $b = 1,306$ $r = 0,99975^{**}$	$a = 1,25 \times 10^{-5}$ $b = -0,008$ $r = 0,87358^{*}$

Tab. 5: Korrelation zwischen spezifischer Bindung zweier Seren und Zellzahl in zwei Assays (* = $p < 0,1$, ** = $p < 0,05$, *** = $p < 0,01$)

3.3.7.2.2 Korrelation zwischen Verteilung der Inselzellarten und Bindung

Die in 3.3.7.2.1 erwähnte Inkonstanz der Antigenmenge könnte auf dem unterschiedlichen Anteil an Betazellen in den verschiedenen Inselzellpräparationen beruhen.

Da sich Betazellen in ihrer Größe (ca. $50 \mu\text{m}^2$) von Nichtbetazellen (ca. $20 \mu\text{m}^2$) unterscheiden (146), kann der Anteil an Betazellen relativ leicht bestimmt werden.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden in 3 Präparationen die relativen Anteile an Betazellen, Nichtbetazellen sowie an gruppierten Zellen nach Größe bestimmt und die durch Multiplikation mit der Gesamtzahl erhaltenen Absolutzahlen mit den entsprechenden Bindungen, die im Assay nach 2.7 bestimmt wurden, korreliert.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 6. Während sich erwartungsgemäß eine positive, wegen der geringen Anzahl jedoch nicht signifikante Korrelation zwischen spezifischer Bindung des pathologischen Serums D und dem Anteil der Betazellen ergab, korrelierte die spezifische Bindung des Normalserums L negativ mit dem Anteil der Betazellen und positiv mit dem Anteil an anderen Zellen.

	große Zellen	kleine Zellen	Zellen in Gruppen
Bindung Serum D	0.83072	-0.92708	-0.66736
Bindung Serum L	-0.90569 *	0.93031 *	0.99894

Tab. 6: Zusammenhang zwischen spezifischer Bindung und Anteil der verschiedenen Zellpopulationen in drei Assays (Korrelationskoeffizienten,
* = $p < 0,1$, ** = $p < 0,005$)

3.3.7.2.3 Bindung von Mischungen verschiedener Zellpräparationen

Zur weiteren Untersuchung wurden aus 3 verschiedenen Präparationen (I, II und III), die auf die gleiche Zellkonzentration eingestellt waren, durch Mischen zu gleichen Teilen die Suspensionen A (I + II), B (II + III), C (I + III) sowie D (I + II + III) hergestellt.

Mit diesen Suspensionen wurden die Seren H und L (siehe 3.3.1) im Assay nach 2.7 getestet.

Das Ergebnis zeigt Abb. 27. Da die Bindung sich nicht anteilmäßig verhält, die Zellzahl jedoch sicher im linearen Bereich der Kurve 'Bindung versus Zellzahl' liegt und somit ein Plateau-effekt ausgeschlossen werden kann, muß auf das Vorhandensein mehrerer Antigene und/oder verschiedener Antikörper geschlossen werden.

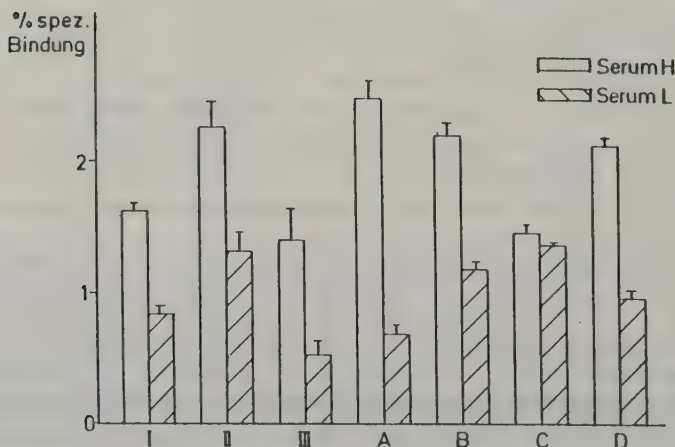


Abb. 27: Spezifische Inselzellbindungen der Seren H und L an Inselzellen aus 3 verschiedenen Präparationen und aus Mischungen derselben (jeweils Dreifachwerte, MW $\pm$ SEM)

3.3.7.3 Standardisierung mit Hilfe von Referenzseren

In Abb. 28 sind die Ergebnisse aus 12 Versuchen, in denen die Seren L, H und D verwendet wurden, dargestellt. In dieser Abbildung kommt zum Ausdruck, daß sowohl die spezifische Bindung des Normalserums L als auch die Differenzen zwischen den pathologischen Seren und dem Normalserum innerhalb der Assays erheblich variiert, jedoch die Reihenfolge innerhalb eines Assays konstant blieb. Aus diesem Grunde und wegen der in 3.3.7.2 gezeigten Korrelation der Bindungen verschiedener pathologischer Seren zur Bindung eines Normalserums, bot sich die Verwendung von Referenzseren an.

Hierbei wird der relative Anteil der Bindung nach folgender Formel berechnet:

$$\text{rel. Bindung} = \frac{\text{Bindung Patientenserum} - \text{Bindung niedrige Ref.}}{\text{Bindung hohe Ref.} - \text{Bindung niedrige Ref.}}$$

Dies wurde mit den oben erwähnten Seren durchgeführt, wobei Serum L als niedrige, Serum D als hohe Referenz und Serum H als Testserum zur Untersuchung der Interassayvariabilität anhand dieser 12 Versuche diente.

Während der Interassayvariationskoeffizient der Absolutwerte der 3 Seren durchschnittlich 73,23 % betrug, ergab sich für den Interassayvariationskoeffizienten der relativen Bindung des Serums H ein Wert von 29,12 %.

Ebenso wurden 2 Assays, in denen jeweils 16 Seren, sowohl von Normalpersonen als auch von Patienten, getestet worden waren, nach dieser Methode verglichen. Das Ergebnis zeigt Abb. 29. Während die spezifischen Bindungen der Patientenserien in Assay 1 0,78 % bis 2,89 % und in Assay 2 1,22 % bis 3,0 % betrugen, zeigt sich für die relativen Bindungen eine bessere Vergleichbarkeit der zwei Assays, welche sich in der Steigung der Korrelationsgeraden von 0,973 manifestiert.

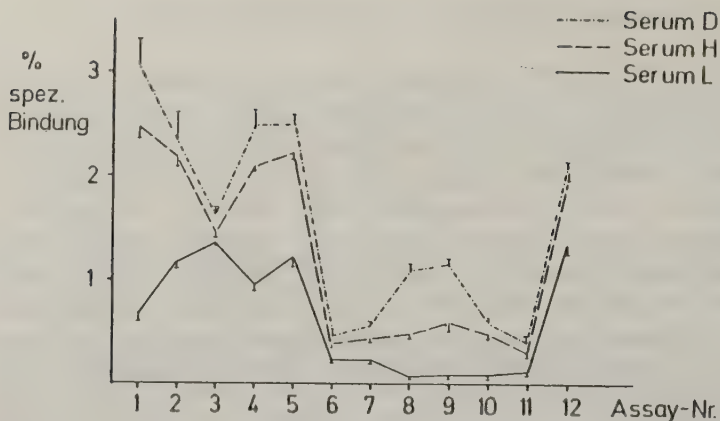


Abb. 28: Spezifische Bindung der Seren L, H und D in zwölf Assays (jeweils Dreifachwerte, MW $\pm$ SEM)

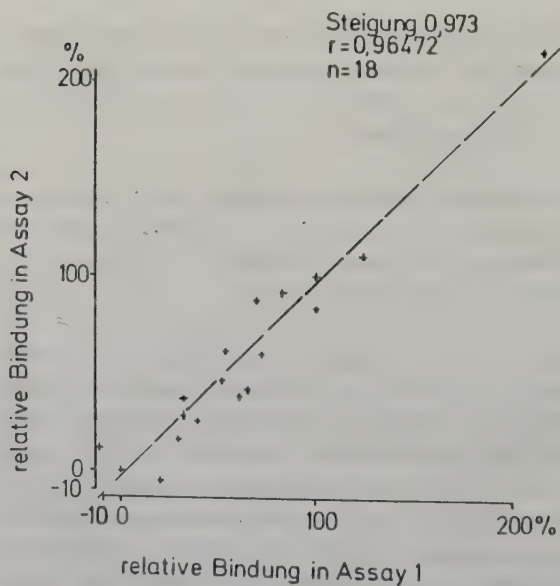


Abb. 29: Mit Hilfe der Seren H und L normalisierte Bindungen von 16 Seren in 2 Assays (* = $p < 0,001$)

3.3.8 Normalbereich

Als langfristige Referenzseren wurden die Seren S und D verwendet, da sie in allen Assays die größte Differenz in ihren jeweiligen spezifischen Bindungen aufwiesen.

Da die Standardisierung nach 3.3.7.3 zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Assays führte, wurde nach dieser Methode ein Normalbereich bestimmt. Hierbei dienten die in 3.3.2.3 erwähnten gesunden Probanden sowie Proband L als Normalkollektiv.

Die so bestimmten relativen Bindungen des Normalkollektivs ergaben einen Mittelwert von 24,30 %, einen Vertrauensbereich (MW $\pm$ 2 SD) von 0,33 bis 48,93 % und einem Kontrollbereich (MW $\pm$ 3 SD) von - 12,64 bis 61,24 %.

3.4 Untersuchung von Patientenseren

3.4.1 Patientenkollektiv

Untersucht wurden 68 Seren von 42 Patienten, die sich in den Jahren 1984 und 1985 in stationärer oder ambulanter Behandlung in der Medizinischen Klinik Innenstadt, München, bzw. im Hauner'schen Kinderspital, München, befunden haben. Das Durchschnittsalter betrug 26,3 $\pm$ 2,33 Jahre (Bereich 3 - 64 Jahre). Unter diesen Patienten befanden sich 11 Kinder, die wegen der Erstmanifestation eines Typ-1-Diabetes behandelt wurden.

Unter den Patienten der Medizinischen Klinik Innenstadt (n = 31) befanden sich 25 Typ-1-Diabetiker, 2 Typ-2-Diabetiker, 2 Patienten mit sekundärem Diabetes (Pankreaskarzinom, chronische Pankreatitis), 2 Patienten mit Polyendokrinopathie sowie 1 Patientin mit Morbus Basedow. 9 von 10 Patienten, bei denen die Histokompatibilitätsantigene untersucht wurden, hatten Dr 3 und/oder 4.

Bei den Typ-1-Diabetikern waren 7 Patienten, die wegen langbestehendem Diabetes und schwerer Spätkomplikationen pankreastransplantiert worden waren (5 simultan Niere-Pankreas, 2 single pancreas). Die mittlere Diabetesdauer der anderen Typ-1-Diabetiker ($n = 18$) betrug $6,77 \pm 2,64$ Jahre (Bereich 0 - 44 Jahre).

3.4.2 Prävalenz

Als positiv wurde ein Serum betrachtet, dessen relative Bindung (siehe 3.3.7.3) größer war als die des Kontrollbereichs ($MW + 3 SD$, siehe 3.3.8). Unter den 68 Proben wurden 31 Seren gefunden, die eine relative Bindung von mehr als 61,3 % aufwiesen.

3.4.2.1 Prävalenz bezogen auf das Lebensalter

In Abbildung 30 ist die Prävalenz, d. h. der Anteil positiver Befunde bei Typ-1-Diabetes, in Abhängigkeit vom Lebensalter aufgetragen. Hierbei ist zu beachten, daß die Ergebnisse dadurch verzerrt werden, daß es sich bei den Patienten unter 14 Jahren aus dem von Hauner'schen Kinderspital ausschließlich um Kinder mit Erstmanifestation eines Typ-1-Diabetes handelt und von diesen Patienten keine Seren nach längerer Diabetesdauer erhältlich waren.

3.4.2.2 Prävalenz bezogen auf Diabetesdauer

In Abbildung 31 ist die Prävalenz in Abhängigkeit von der Diabetesdauer gezeigt. Während der Anteil positiver Befunde bei einer Diabetesdauer unter 1 Monat 67 % beträgt, läßt sich über die Prävalenz bei längerem Bestehen wegen der geringen Anzahl in den einzelnen Gruppen keine definitive Aussage machen. Jedoch wurden auch bei langer Diabetesdauer (> 5 Jahre) noch positive Seren gefunden.

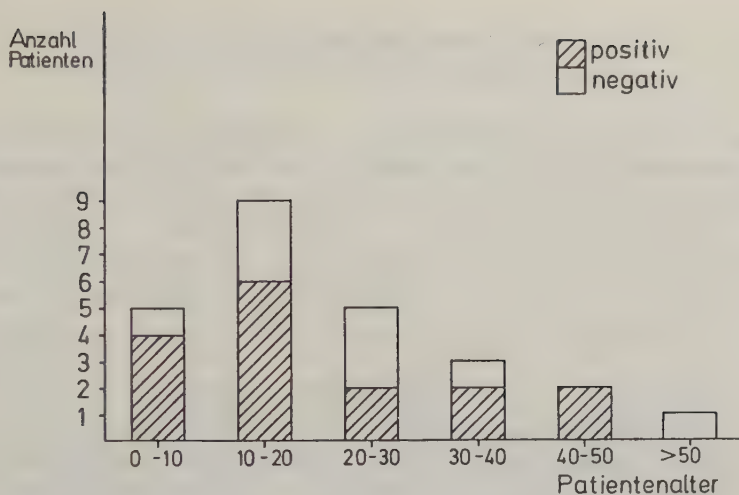


Abb. 30: Prävalenz positiver Seren in Abhängigkeit vom Lebensalter (Bindung größer als MW $\pm$ 3 SD)

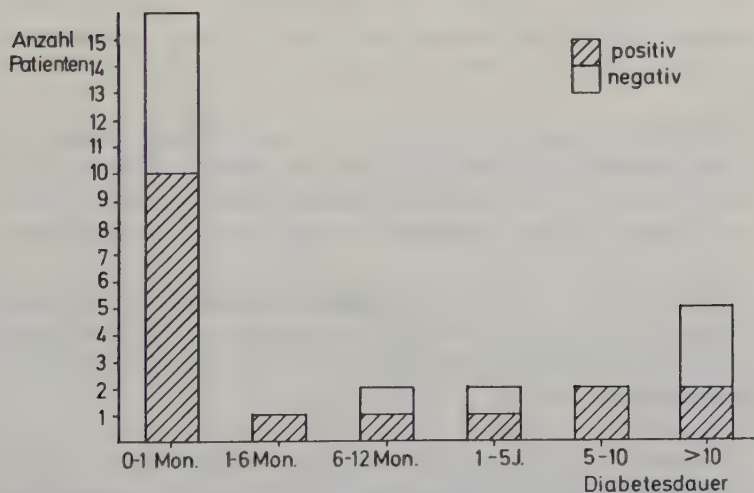


Abb. 31: Prävalenz positiver Seren in Abhängigkeit von der Diabetesdauer (Bindung größer als MW $\pm$ 3 SD)

3.4.3 Verhalten der ICSA-Spiegel bei pankreas- transplantierten Patienten

Von 6 Pankreastransplantierten liegen postoperative Mehrfachbestimmungen von ICSA-Spiegeln vor. Die Verläufe jeweils eines Patienten wurden im gleichen Assay bestimmt.

1. Patientin E. B.: 22 Jahre, 19 Jahre Diabetes, single Pankreas, kurz nach Transplantation Funktionsverlust. ICSA-Spiegel 8 und 15 Monate nach Transplantation normal.
2. Patientin A. H.: 24 Jahre, Diabetes seit dem 1. Lebensjahr, Simultantransplantation, 9 Monate nach Transplantation ansteigende Blutzuckerspiegel und Insulinbedürftigkeit. Simultaner Anstieg des ICSA-Spiegels (3 und 10 Monate nach Transplantation), jedoch immer normal.
3. Patientin R. M.: 30 Jahre, 19 Jahre Diabetes Simultantransplantation, 11 Monate nach Transplantation Einschränkung der Transplantatnierenfunktion, nach 19 Monaten Funktionsverlust. Pankreasfunktion jedoch immer gut. Starker Anstieg der ICSA-Werte von subnormal (6 Monate nach Transplantation) über normal (11 Monate) auf stark pathologisch (17 Monate).
4. Patient D. P.: 47 Jahre, 22 Jahre Diabetes, Simultantransplantation, postoperative Abstoßung, Pankreasfunktion jedoch immer gut. Fallende ICSA-Spiegel (6 und 10 Monate nach Transplantation), immer pathologisch.
5. Patient H. R.: 29 Jahre, 14 Jahre Diabetes, Single Pankreas, keine Organfunktion postoperativ. ICSA-Spiegel fallend (6 Wochen und 4 Monate nach Transplantation), immer pathologisch.
6. Patient G. S.: 35 Jahre, Simultantransplantation, 2 Jahre nach Transplantation Abstoßung, beide Organe ohne Funktion. ICSA-Spiegel ansteigend von normal (20 Monate nach Transplantation) auf pathologisch (26 Monate).

3.4.4 Verhalten von ICSA-Spiegeln unter immunsuppressiver Therapie des Typ-1-Diabetes

Es liegen die Verläufe von ICSA-Spiegeln von 2 Patienten vor, die mit Cyclosporin A immunsuppressiv behandelt werden. Hier sind die gemessenen relativen Bindungen im ICSA-Assay dem Anteil des glycosilierten Hämoglobins am Gesamt-Hb gegenübergestellt. Abb. 32 zeigt dies für die Patientin A. A., Abb. 33 für den Patienten G. F.

Während die Therapie bei der Patientin A. A. (14 Jahre) erfolgreich war und die gemessenen ICSA-Werte korrespondierend zum glycosilierten Hämoglobin (HbA_{1c}) zurückgingen, ohne jedoch Normalwerte zu erreichen, ist Patient G. F. (17 Jahre) zum jetzigen Zeitpunkt insulinpflichtig und die CyA-Therapie wurde abgebrochen. Obwohl die bei ihm gemessenen Werte nie pathologisch waren, zeigt der Verlauf eine auffallende Ähnlichkeit zum Wiederanstieg des HbA_{1c} .

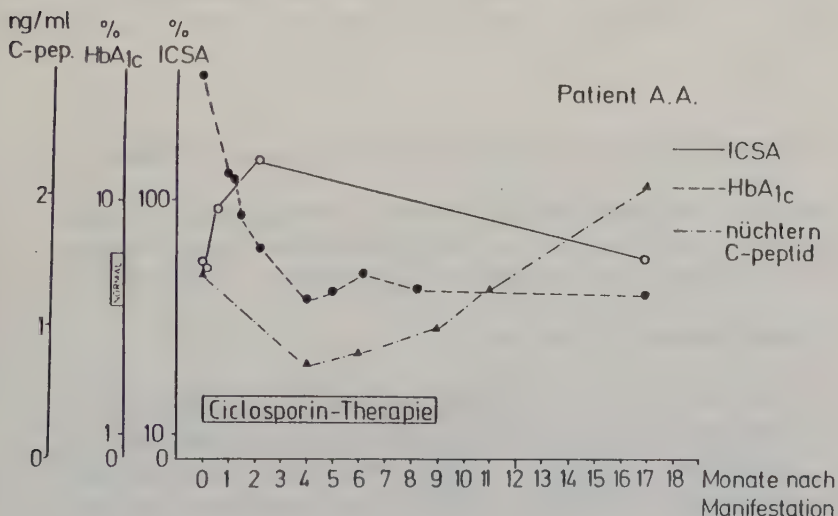


Abb. 32: Verlauf der ICSA-C-Peptid- und HbA_{1c} -Spiegel bei der Patientin A. A. unter Cyclosporin-Therapie

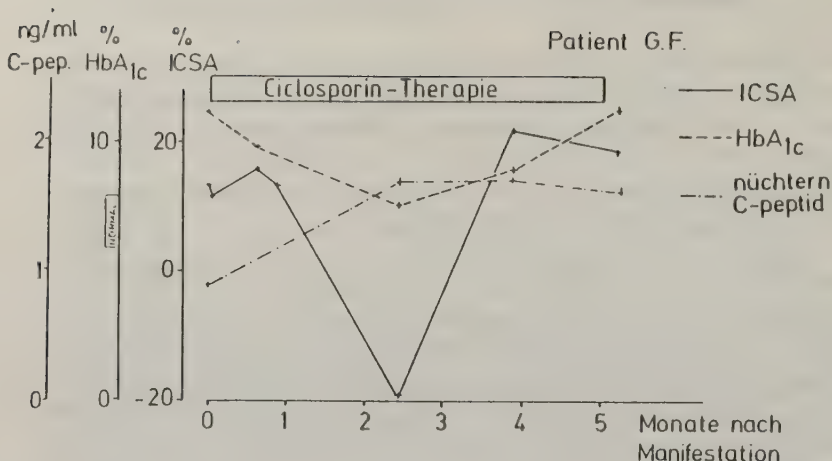


Abb. 33: Verlauf der ICSA-C-Peptid- und HbA_{1c}-Spiegel beim Patienten G. F. unter Cyclosporin-Therapie

3.4.5 Positive Ergebnisse ohne bestehenden Typ-1-Diabetes

Bei den untersuchten 68 Patientenproben wurden 4 falsch-positive Befunde, d. h. relative Bindung größer als Kontrollbereich ohne bestehenden Typ-1-Diabetes, festgestellt.

Hierbei handelt es sich um:

1. Patient H. T., 64 Jahre. Diagnosen: Leberzirrhose, M. Addison vom Autoimmuntyp, chronische Pankreatitis mit sekundärem Diabetes, primär chronische Polyarthrititis, mikrosomale Antikörper, ICSA-Spiegel grenzwertig positiv.
2. Patient A. B., 39 Jahre. Diagnosen: Polyendokrinopathie, Antikörper gegen Nebennierenrinde, Parietalzellen, Thyreoglobulin, Mikrosomen nachweisbar. ICSA-Spiegel grenzwertig positiv.

3. Normalperson H., (siehe 3.3.1), 27 Jahre, männlich, Vater Typ-1-Diabetes, Zustand nach Mononucleosis infectiosa. ICSEA-Spiegel mehrfach pathologisch (2 Werte im Abstand von einem Jahr).
4. Patientin M. H., 46 Jahre. Diagnosen: Hyperthyreose vom Typ Basedow. Beide Großmütter mütterlicherseits und Mutter Typ 1 Diabetes. ICSEA-Werte deutlich pathologisch.

4. Diskussion

4.1 Inselisolation

Während die ersten Arbeiten (73, 94, 133) zur Isolation von Inseln aus Nagetierpankreaten schon lange bekannt sind, wurden erst in letzter Zeit effektive Methoden zur Inselisolation aus Pankreaten höherer Säugetiere (40, 79, 93, 95) veröffentlicht. Hier sind jedoch die erzielten Ausbeuten bei Säugetieren um den Faktor 10 geringer als bei Nagetieren. Dies und der schwierige Zugang zu Humanpankreas führte zu der Entscheidung, doch weiterhin Nagetiere als Quelle für das Antigen des ICSA-Assays zu verwenden. Die Methode erscheint gerechtfertigt, da Baekkeskov et al. (3, 4, 6) zeigen konnten, daß ICSA aus Serum diabetischer Patienten sowohl mit humanem Inselzellprotein reagieren als auch mit Inselzellprotein von Nagetieren kreuzreagieren.

Aus der Originalmethode (94) zur Isolation von Inseln aus Nagetieren entstanden jedoch bis heute zahlreiche Modifikationen (Übersicht bei 164). Diese Modifikationen beziehen sich v. a. auf drei kritische Punkte der Inselisolation:

1. Zur effektiven Kollagenaseverdauung ist ein gründlicher Gewebsaufschluß notwendig. Diesen Schritt versuchte man durch Verwendung von "Tissue-Choppern" zu standardisieren (59, 116).
2. Die Effektivität der Kollagenaseverdauung variiert zwischen den Kollagenasepräparationen verschiedener Firmen. Daher wurde versucht, mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung Kollagenasepräparationen mit einheitlicher Eignung für die Inselisolation herzustellen (30) oder die Isolierung zu automatisieren (168).
3. Viele Modifikationen zielen auf eine Verbesserung der zeitaufwendigen und recht unsicheren Trennung von endokrinem und exokrinem Gewebe unter einem Stereomikroskop hin, entweder mit Hilfe von Dichtegradienten (siehe 3.1.2) oder durch Verwendung von Grünlicht (52).

Durch die Verwendung von Neutralrot, einem Supravitalfarbstoff mit geringer Toxizität (113), der daher auch bei Zellkulturen angewandt wird (35), war es möglich, das in "Methoden" beschriebene Verfahren aufzustellen. Dieses Verfahren stellt eine Abwandlung der von Tze (179) publizierten Methode dar. Die hiermit erzielten Ausbeuten liegen im Rahmen der bisher publizierten Werte (164), wohingegen ein kürzlich veröffentlichtes Verfahren (145) die Ausbeute durch intraduktale Vorverdauung des exokrinen Gewebes noch steigern zu können scheint.

Über die Gründe, warum weder mit Ficoll noch mit Percoll in dem unter "Methoden" beschriebenen Verfahren eine effektive Trennung von exokrinem und endokrinem Gewebe erreicht werden konnte, kann nur spekuliert werden. Ein möglicher Faktor ist die Verwendung von trypsinarmer Kollagenase der Fa. Sigma. Unter Umständen wird durch die Begleitenzyme, die in roheren, von mehreren Autoren (166, 21, 22) verwendeten Kollagenasepräparationen vorhanden sind, die Präparation anders angedaut und dadurch die Trennung erleichtert.

Die in der Literatur erwähnten möglichen Schädigungen durch Kollagenase (133), Ficoll (166) oder Neutralrot (113) konnten bei Untersuchungen der Funktion und Morphologie der isolierten Inseln nicht festgestellt werden.

4.2 Zelldissoziation

Für die Bestimmung von betazellspezifischen Oberflächenantikörpern wäre eine Suspension von intakten Betazellen Voraussetzung. Erst in letzter Zeit wurden jedoch Methoden entwickelt, die, ausgehend von einer gemischten Inselzellpopulation, Betazellen entweder mit Hilfe der Elutriation (31) anreichern oder mit einem fluoreszenzaktivierten Zellsorter isolieren (153). Da diese Methoden aber einen weiteren Verlust an Ausgangsmaterial mit sich bringen, gehen beinahe alle veröffentlichten Methoden zur Messung von ICSA in Patientenseren von einer gemischten Inselzellsuspension aus, zumal darin die Betazellen mit ca. 80 % den

Hauptanteil darstellen (144).

Die empfohlenen Rezepte zur Gewinnung von Einzelzellen sind vielfältig (Übersicht bei 144). Sie basieren entweder auf Kalziumentzug, mechanischer Bearbeitung oder Inkubation mit Enzymen oder aus Kombinationen dieser Grundprinzipien. Hierbei ist zu bemerken, daß bei Verwendung nur eines Enzyms die erforderlichen Konzentrationen um Zehnerpotenzen größer sind als bei Verwendung von Enzymkombinationen. Dies trifft sowohl für Trypsin (143) als auch für DNase (27, 147) zu. Daher werden Methoden bevorzugt, die aus einer mechanischen Bearbeitung von Inseln in kalziumfreiem Puffer bei niedrigen Trypsin- und DNase-Konzentrationen bestehen (144, 145). Hierbei soll Trypsin die mechanische Behandlung erleichtern und DNase die Reaggregation von Einzelzellen durch eventuell freiwerdende DNA verhindern. Als Alternative schlug Ono (139) die Verwendung von Dispase vor, einem proteolytischen Enzym aus *Bacillus polymyxa*, mit dem er einen hohen Anteil von einzelnen Zellen erreichen konnte. Mit der unter 2.5 beschriebenen Methode, die auf dem von Pipeleers (146) erstmals 1981 publizierten Verfahren beruht, bei dem eine sehr niedrige Trypsin- und DNasekonzentration zur Zellisolierung benutzt wird, konnten auf Anhieb gute Ergebnisse erzielt werden. Hervorzuheben ist hier vor allen Dingen der niedrige Anteil an toten Zellen (max. 10 %), wodurch der Anteil an cytoplasmatischen Antikörpern, die im Assay miterfaßt wurden, wahrscheinlich gering ist.

4.3 Protein-A-Assay

Protein A ist ein Zellwandbestandteil bestimmter *Staphylococcus aureus*-Stämme (v. a. Cowan I) und bindet Immunglobuline verschiedener Spezies (99, 100). Bei einer Vielzahl immunologischer Verfahren wird es entweder als universeller zweiter Antikörper (100) oder, mit Isotopen markiert, als universeller Tracer (98, 101) benutzt. Mit Farben oder Schwermetallen markiert, wird es sowohl in der Licht- als auch in der Elektronenmikroskopie verwendet (160). Protein A wurde schon früh zur Quantifizierung von membrangebundenen Antikörpern (10, 19, 182) eingesetzt.

Von den humanen Immunglobulinen werden vor allem IgG₁, IgG₂ und IgG₄, nicht jedoch IgG₃ und IgM gebunden (74).

Die Versuche zur unspezifischen Bindung (siehe 3.3.2) waren notwendig, da die erwartete Bindung von radioaktivem Protein A an die Zelloberfläche (74) in der Größenordnung der Standardabweichung der unspezifischen Bindung von Protein A an unbehandelte Röhrchen lag. In der Literatur werden 3 Möglichkeiten zur Lösung dieses Problems angegeben:

1. Zentrifugation der Zellen durch Öl, nachdem sie mit Serum und Tracer inkubiert worden sind (74)
2. Nur das gewaschene Sediment, das sich nach der Inkubation in der abgeschnittenen Röhrchenspitze befindet, wird gezählt (41, 43)
3. Die Verwendung von speziell für diesen Zweck hergestellten Minisorb-Röhrchen (41).

Alle 3 Varianten ergaben nicht die gewünschte Genauigkeit.

Mit der in "Methoden" dargelegten Vorinkubation der Assay-röhrchen konnten Werte für die unspezifische Bindung erreicht werden, die denen von Minisorb-Röhrchen vergleichbar ist. Zudem konnten durch die Verwendung des Mikro-RIA- Systems der Fa. Sarstedt erhebliche praktische Vorteile erreicht werden, die unter anderem in der akzeptablen Intraassayvariabilität ihren Niederschlag finden.

4.4 Spezifität

Sowohl für das gut charakterisierte Hasenserum R4 (41) als auch für Humansenen konnte durch Adsorption mit Inselzellen eine Verminderung der spezifischen Bindung gezeigt werden (siehe 3.3.5.4), was auf die Spezifität der Bindung hinweist.

Die gegenüber Normalseren immer noch erhöhte Restbindung könnte auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: Zum einen ist es denkbar, daß die maximal verwendete Zellzahl nicht

ausreichte, hochtitrige inselzellspezifische Antikörper zu adsorbieren, zum anderen besteht die Möglichkeit, daß in den Seren Antikörper gegen allgemeine Gewebsantigene vorhanden sind, da ja u. a. im xenogenen System gearbeitet wurde. So konnten Huen et al. (74) durch Präadsorption der Seren mit Azeton-Leber- und Nierenpulver eine Verminderung der Protein A-Bindung sowohl bei Normal- als auch bei Diabetikerseren erreichen. Jedoch wurde hierdurch die Differenz der Bindungen zwischen Normal- und Diabetikerserum nicht beeinflußt.

4.5 Interassayvariabilität

Die bemerkenswerte Interassayvariabilität stellt eine der Hauptschwierigkeiten des Assays dar und wurde schon in der Erstveröffentlichung (74) erwähnt.

Es wird vor allem die Festlegung des Normalbereichs erschwert, da dieser eine beträchtliche Variationsbreite hat. Die Mitführung nur eines Kontrollserums (74) erscheint nicht ausreichend, die Einbeziehung eines genügend großen Normalkollektivs in jedem Assay scheitert an der Begrenzung des Zellmaterials. Weiterhin wurde vorgeschlagen, verschiedene Inselzellpräparationen zu poolen, da die Interassayvariabilität auf schwer beeinflussbare Faktoren wie Kollagenase- und Trypsininkubation zurückgeführt wurde.

Dieser Vorschlag erscheint jedoch wenig sinnvoll, da, wie in 3.3.5 dargestellt, die spezifische Bindung einer Inselzellpräparation schon nach 7 Tagen vermindert ist und somit nur wenige Präparationen gepoolt werden können. Diese Beobachtung erhält Unterstützung durch die Tatsache, daß die in der Erstveröffentlichung genannte maximale Verwendungszeit von 7 Wochen (74) von den Autoren auf 2 Wochen (44) revidiert wurde.

Eine weitere Methode, die Interassayvariation zu vermindern, ist die Verwendung eines Betazellklons (RIN5F). Dieser wächst in Kultur und kann allein durch Kalziumentzug geerntet werden. Dyrberg et al. (46) zeigten eine statistisch

signifikante Korrelation zwischen der Bindung an isolierte Ratteninselzellen und der Bindung an kultivierte RIN5F-Zellen, allerdings unterscheidet sich nach Baekkeskov (2) dieser Klon sowohl in der Funktion als auch in der Antigenität von Ratteninselzellen, insbesondere nach mehreren Kulturgenerationen.

Ob durch die Verwendung des Humanzellklons JHPI-1 (127, 128) dasselbe Antigen wie mit Ratteninselzellen gemessen wird oder ob ähnliche Einschränkungen wie beim RIN5F gelten, ist derzeit noch nicht bekannt.

Eine weitere Möglichkeit, die Interassayvariation zu vermindern, stellt das in "Ergebnisse" unter 3.3.7.3 beschriebene Verfahren dar. Durch die dargestellte Normalisierung erscheint es möglich, mit Hilfe von drei Seren einen Assay bezüglich seiner Bindungseigenschaften zu charakterisieren und zu kontrollieren.

Die daraus ermittelten relativen Bindungen zeigen sowohl beim Vergleich eines Serums in mehreren Assays als auch mehrerer Seren in zwei Assays sehr viel geringere Interassayvariationskoeffizienten als die entsprechenden Absolutwerte der spezifischen Bindung. Daher erschien die einmalige Bestimmung eines Normalkollektivs, das zudem eine beträchtliche Variation aufwies, als gerechtfertigt.

4.6 Bestimmung von ICSA in Patientenseren

Ausgehend von der Standardisierung mit Hilfe von Referenzseren (siehe 3.3.7.3) und der Festlegung eines Normalbereichs (3.3.8) konnten bei 2/3 der Patienten zum Manifestationszeitpunkt der Diabetes mellitus pathologische Werte gefunden werden (siehe 3.4). Abhängig von der verwendeten Methode und der Definition des Normalbereichs variieren die Angaben in der Literatur.

Während bei der Untersuchung von Patienten mit unterschiedlicher Diabetesdauer bei ca. 30 % erhöhte ICSA-Titer gefunden wurden (74, 109), konnten sowohl bei Kindern (110) als auch bei Erstmanifestation (181) in 67 % der Fälle ein Vor-

liegen von ICSA beobachtet werden. Levy-Marchal et al. (112) stellten bei 6 von 7 frisch erkrankten Kindern complementfixierende Antikörper fest. Höhere Werte fanden Michaelis und Mitarbeiter (131) mit 76 % bei Diabetikern allgemein.

Übereinstimmend wird eine Abnahme der ICSA-Spiegel im Laufe des ersten Jahres nach Manifestation berichtet (181, 180).

Während die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte bei Erstmanifestation gut mit denen der oben erwähnten Autoren vergleichbar sind, kann über das Verhalten der ICSA-Spiegel während des 1. Jahres nach Diabetesmanifestation wegen der geringen Probenanzahl keine definitive Aussage gemacht werden.

Die positiven Befunde ohne manifeste Diabetes mellitus (siehe 3.4.5) können auf zwei Ursachen zurückgeführt werden:

1. Bei den 2 Patienten mit Polyendokrinopathie lagen nur leicht erhöhte Werte vor. Beide hatten auch Autoantikörper gegen andere Gewebe, wie Nebennierenrinde und Mikrosomen.
2. Die 2 anderen positiven Befunde wurden bei Verwandten 1. Grades von Typ-1-Diabetikern gefunden. Im Gegensatz zu ICA (156) liegen über die Bedeutung von positiven ICSA-Spiegeln bei Verwandten von Typ-1-Diabetikern keine Untersuchungen vor, jedoch ist das Auftreten von Autoantikörpern bei nicht erkrankten Verwandten 1. Grades auch von anderen Autoimmunerkrankungen, wie z. B. Myasthenia gravis bekannt (106).

Über die Bedeutung von ICSA-Verläufen unter immunsuppressiver Therapie (3.4.4) können wegen der geringen Patientenzahl keine endgültigen Aussagen gemacht werden. Während das Verhalten der ICSA-Spiegel bei der bis jetzt erfolgreich therapierten Patientin A. A. als ein normaler Abfall des ICSA-Spiegels im Verlauf des ersten Jahres nach Manifestation gedeutet werden könnte, legt der Wiederanstieg der ICSA-Spiegel mit gleichzeitigem Anstieg des HbA_1 und begin-

nender Insulinbedürftigkeit den Verdacht nahe, daß es zu einem Wiederaufflammen des autoimmunologischen Prozesses gekommen ist.

Um die Wertigkeit der Messung von ICSPA-Spiegeln als Verlaufskontrolle abschließend beurteilen zu können, sind jedoch Untersuchungen an weiteren Patienten notwendig.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Gruppe der Pankreastransplantierten (siehe 3.4.3). Die Tatsache, daß bei 2 Patienten (A. H., G. S.) eine Pankreasabstoßung von einem ICSPA-Anstieg und bei einem Patienten (D. P.) eine erfolgreiche Abstoßungstherapie von einem Titerabfall begleitet ist, lenkt das Interesse auf ICSPA-Verläufe als Abstoßungsparameter.

Als Abstoßungsparameter scheint der ICSPA-Spiegel nur dann von Bedeutung zu sein, wenn Ausgangswerte, d. h. Werte vor oder direkt nach der Transplantation vorliegen, da einige der gemessenen Werte, obwohl stark ansteigend, noch im Normalbereich lagen.

Auch hier sind Untersuchungen eines größeren Patientenkollektivs notwendig.

5. Zusammenfassung

Hauptziel der Arbeit war die Aufstellung eines Assays zur Bestimmung von Inselzelloberflächenantikörpern.

Hierzu war eine Methode zur Inselisolation aus Rattenpankrea notwendig, welche die benötigte Menge an Antigenmaterial in vertretbarem Zeitaufwand liefert.

Die gezeigte Methode der Inselisolation erbringt konstante und reproduzierbare Inselausbeuten.

Desweiteren war eine Methode zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus isolierten Inseln aufzustellen. Das gefundene Verfahren der Zelldissoziation ergibt befriedigende und reproduzierbare Ergebnisse mit einem minimalen Anteil an toten Zellen.

Mit den so gewonnenen Ratteninselzellen als Antigen wurde ein Radioligandenassay zur Messung von Inselzelloberflächenantikörpern erarbeitet. Hierzu waren ausführliche Untersuchungen über methodische Probleme, wie unspezifische Adsorption von Immunglobulinen an Oberflächen notwendig.

Die Intraassayvariabilität konnte durch technische Detailverbesserungen erheblich verringert werden.

Durch Adsorptionsversuche konnte die Spezifität des Assays gezeigt werden.

Die auch von anderen Autoren gefundene beträchtliche Interassayvariabilität konnte durch Mitführung von Referenzseren vermindert werden.

Durch Untersuchung von Patientenseren konnten die von anderen Autoren gefundenen Prävalenzraten bestätigt werden. Sowohl bei Normalpersonen als auch bei Patienten ohne Typ-1-Diabetes wurden positive Befunde festgestellt. Mögliche Gründe hierfür, wie familiäre Diabetesbelastung oder Po-

lyendokrinopathien, werden diskutiert.

Anhand von ICESA-Verläufen unter immunsuppressiver Therapie bei Diabeteserstmanifestationen und nach Pankreastransplantation wird die mögliche diagnostische Bedeutung von Inselzell-oberflächenantikörpern erörtert.

6. Literaturverzeichnis

1. Alviggi, T., P. J. Hoskens, D. A. Pyke, C. Johnston,
D. E. H. Tee, R. D. G. Leslie: Pathogenesis of
insulin-dependent Diabetes: A Role for Activated
T-Lymphocytes.
Lancet II: 4 - 5 (1984)
2. Andersson, A., C. Hellerström: Metabolic Characteristics
of Isolated Islets in Tissue Culture.
Diabetes 21 (2): 546 - 554 (1972)
3. Baekkeskov, S.: Radiolabeling and Immunoprecipitation of
Islet Cell Antigens.
In J. Larner, S. L. Pohl: Methods in Diabetes Research
1A. Harper, London 1984, 130 - 139.
4. Baekkeskov, S., Å. Lernmark: Rodent Islet Cell Antigens
Recognized by Antibodies in Sera from Diabetic
Patients.
Acta biol. med. germ. 41: 1111-15 (1982)
5. Baekkeskov, S., Å. Lernmark: A Beta-Cell Glycoprotein of
Mr 40000 Is The Major Rat Islet Cell Immunogen
Following Xenogenic Immunisation.
Diabetologia 27: 70 - 73 (1984)
6. Baekkeskov, S., J. Nielsen, B. Marner, T. Bilde, J. Lud-
vigson, Å. Lernmark: Autoantibodies in Newly Dia-
gnosed Diabetic Children Immunoprecipitate Specific
Human Pancreatic Islet Cell Protein.
Nature 298: 167 - 69 (1982)
7. Banatvala, J. E., G. Schernthaner, E. Schober, L. M.
De Silva, J. Bryant, M. Borkenstein, D. Brown,
M. A. Menser: Coxsackie B, Mumps, Rubella and
Cytomegalievirus Specific IgM Responses in Patients
with Juvenile Onset Insulin Dependent Diabet. Mell.
in Britain, Austria and Australia.
Lancet: 1409 - 1412 (1985)

8. Betterle, C., A. Caretto, A. Trengo, A. Trevisan: Complement-Fixing Islet-Cell Antibodies in Type I Diabetes and in Susceptible Patients with Autoimmune Diseases. *Lancet I*: 1418 (1980)
9. Betterle, C., F. Zanette, A. Fiengo, A. Trevisan: Five-Year Follow-Up of Non-Diabetes with Islet-Cells Antibodies. *Lancet I*: 284, (1982)
10. Biberfeld, P., V. Gheti, J. Sjöquist: Demonstration and Assaying of IgG Antibodies in Tissues and on Cells by Labelled Staphylococcal Protein A. *J. immunol. Meth.* 6: 249-259 (1975)
11. Bone, A. J., R. Walker, J. O. Baird, A. Cook: Development of Diabetes in Development in The BB/E Rat: Parietal Cell, Smooth Muscle, Thyroid Epithelium, Islet Cell Surface and Cytoplasmatic Antibodies and Beta-Cell Function. *Diabetologia* 27: 258A (1984)
12. Bottazzo, G. F.: Beta-Cell Damage in Diabetic Insulitis: Are We Approaching A Solution? *Diabetologia* 26: 241 - 249 (1984)
13. Bottazzo, G. F., A. G. Cudworth, D. J. Moul, D. Doniach, H. Festenstein: Evidence for A Primary Autoimmune Type of Diabetes Mellitus. *Brit. Med. J.* 11: 1253 (1978)
14. Bottazzo, G. F., B. M. Dean, A. N. Gorsuch, A. G. Cudworth, D. Doniach: Complement Fixing Islet Cell Antibodies in Type I Diabetes: Possible Monitors of Active Beta Cell Damage. *Lancet I*: 668 - 672 (1980)
15. Bottazzo, G. F., D. Doniach: Islet Cell Antibodies in Diabetes Mellitus: Evidence of an Antiautogen Common to All Cells in The Islet of Langerhans. *La Ricerca Clin. Lab.* 8: 29 -38 (1978)

16. Bottazzo, G. F., A. Florin-Christensen, D. Doniach:
Islet Cell Antibodies in Diabetes Mellitus with
Autoimmune Polyendocrine Deficiencies.
Lancet II: 1279 - 83 (1974)
17. Bottazzo, G. F., H. Gleichmann: Immunology and Diabetes
Workshop: Report of The First International Work-
shop on The Standardisation of Cytoplasmatic Islet
Cell Antibodies.
Diabetologia 29: 125 - 126 (1986)
18. Brogren, C. H., P. Poussier, F. Hirsch, P. Druet:
Production in The BB Rat of Monoclonal Antibody
Specific for The Surface of Rat Insulin-Producing
Cells.
Diabetologia 27: 260A (1984)
19. Brown, J. P., J. M. Klikmann, K. E. Hellerström:
A Microassay for Antibody Binding to Tumor Cell
Surface Antigens using ^{125}J -Labelled Protein A
from Staphylococcus Aureus.
J. immunol. Meth. 15: 57 - 66 (1977)
20. Bruining, G. J., J. Molenaar, C. W. Tuk, J. Lindemann,
H. A. Bruining, B. Marner: Clinical Time-Course
and Characteristics of Islet Cell Cytoplasmatic
AB's in Childhood Diabetes.
Diabetologia 26: 24 - 29 (1984)
21. Brunstedt, J.: Rapid Isolation of Functionally Intact
Pancreatic Islets from Mice and Rats by Percoll
Gradient Centrifugation.
Diabète et Metab. 6: 87-89 (1980)
22. Brunstedt, J., J. H. Nielsen, A. Lernmark:
Isolation of Islets from Mice and Rats.
in J. Larner, S. L. Pohl: Methods in Diabetes
Research 1C. Verlag Harper, London 1984,
S. 246 - 258

23. Buitrago, A., E. Gylfe, C. Henrikson, H. Pertoft:
Rapid Isolation of Pancreatic Islets from Colla-
genase Digested Pancreas by Sedimentation Through
Percoll at Unit Gravity.
Biochem. biophys. Res. Commun. 79: 823 - 828 (1977)
24. Burck, H. C.: Histologische Technik.
3. Auflage. Verlag Thieme. Stuttgart 1973.
25. Buse, J. B., D. D. Chaplin, A. Ben-Nun, K. A. Klein,
E. S. Eisenbarth, J. G. Seidmann, R. A. Jackson:
Class I, II, III MHC-Gene-Polymorphisms in BB Rats.
Diabetologia 27: 77 - 79 (1984)
26. Cavender, D., B. Rabin, D. Finegold: A New Sensitive
Immunohistochemical Assay for Islet Cell Cyto-
plasmatic Antibodies (ICA).
Diabetes 33 (1): 63A (1984)
27. Charles, M. A., M. Suzuki, L. Slater, N. Waldeck,
K. Ong: Immune Islet Killing Mechanism Associated
with Insulin-Dependent Diabetes: Three Rabbit Anti-
body-Mediated Islet Cell Cytotoxicity Models.
Diabetologia 25: 348 - 354 (1983)
28. Clark, A., D. Smith, H. Chapel: Letter to the Editor.
Lancet I: 479 - 480 (1983)
29. Colman, P. G., I. C. Campbell, L. C. Harrison:
Characterisation of the 64.000 Molecular weight
Autoantigen in Insulin Dependent Diabetes.
Diabetes 34: 69A (1985)
30. Compton F., B. H. R. Miller, M. Bewick: The Fractiona-
tion of Crude Collagenase for Pancreatic Islet
Isolation.
Horm. metab. Res. 12 (Suppl.): 55 - 58 (1982)

31. Dafoe, D. C., D. A. Campbell, M. J. Lorber, R. E. Berlin,
L. E. Kahn, E. J. Loret, J. L. Hudson: Assessment
of Elutriation in Islet Cell Preparation from Porcine
Pancreas.
Diabetes 33 (1): 181A (1984)

32. Davoren, P. R.: The Isolation of Insulin from a Single
Cat Pancreas.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 63: 150 - 153 (1962)

33. Dean, B. M., R. Pujol-Borell, G. F. Bottazzo: Determi-
nation of Islet Cell Antibodies by Immunofluores-
cence.
Lancet II: 1343 - 44 (1982)

34. Debray-Sachs, M., M. Dardenne, W. Savino, M. C. Quiniou,
D. Boillot, W. Gepts, R. Assan: Anti-Islet Immunity
and Thymic Dysfunction in the Mutant Diabetic
C57BL/KsJ db/db Mouse.
Diabetes 32: 1048 - 1054 (1983)

35. De Renzis, F. A., A. Schechtmann: Staining by Neutral
Red and Trypan Blue in Sequence for Assaying Vital
and Nonvital Cultured Cells.
Stain Technol. 48: 135 - 136 (1973)

36. Di Mario, U., W. G. Irvine, D. G. Borsey, J. L. Kyner,
J. Weston, C. Galfo: Immune Abnormalities in Diabetic
Patients Not Requiring Insulin at Diagnosis.
Diabetologia 25: 392 - 395 (1983)

37. Dobersen, M. J., A. M. Bell, A. B. Jenson, A. L. Notkins,
F. Ginsberg-Fellner: Detection of Antibodies to
Islet Cells and Insulin with Paraffin-Embedded
Pancreas as Antigen.
Lancet II: 1078 (1979)

38. Dobersen, M. J., F. Ginsberg-Fellner, A. L. Notkins:
Insulinoma Target Cells for Measurement of Cyto-
toxic Autoantibodies in Patients with IDDM.
Diabetes 30 (1): 65A (1981)

39. Dobersen, M. J., J. E. Scharff, F. Ginsberg-Fellner, A. L. Notkins: Cytotoxic Autoantibodies to Beta Cells in the Serum of Patients with Insulin-Dependent Diab. mell.
New Engl. J. Med.: 1493 - 98 (1980)
40. Downing, R., D. W. Sharp, W. F. Ballinger: An Improved Technique for the Isolation and Identification of Mammalian Islets of Langerhans.
Transplantation 29: 79 - 83 (1980)
41. Dyrberg, T., S. Baekkeskov, Å. Lernmark: Specific Pancreatic Beta-Cell Surface Antigens Recognized by a Xenogenic Antiserum.
J. Cell Biol. 94: 472 - 477 (1982)
42. Dyrberg, T., S. Baekkeskov, Å. Lernmark: The Early Appearance of Islet Cell Antibodies in BB-Rats Later Developing Diabetes is Preceded by Neonatal Lymphopenia.
Diabetes 33 (1): 12A (1984)
43. Dyrberg, T., N. Billestrup: Methods of Using Protein A in Detection of Antibodies.
In J. Larner, S. L. Pohl: Methods in Diabetes Research 1B. Harper, London 1984, 127 - 134
44. Dyrberg, T., J. King, Å. Lernmark, J. M. Martin: Cortison Fails to Affect Levels of Islet Cell Surface Antibodies and Incidence of Diabetes in the BB Rat.
Endocrinology 116: 47 - 50 (1985)
45. Dyrberg, T., Å. Lernmark, J. King, J. M. Martin: Diabetes in the BB-Rat is Preceded by Neonatal Lymphopenia and is Not Affected by Cortison Treatment.
Diabetologia 27: 271A (1984)

46. Dyrberg, T., Å. Lernmark, H. K. Oie, A. F. Gazdar:
Islet Cell Surface Antibodies in Spontaneously
Diabetic BB Rats.
Acta biol. med. germ. 41: 1105 - 1109 (1982)
47. Dyrberg, T., A. F. Nakhooda, S. Baekkeskov, A. Lernmark,
P. Poussier, E. B. Marliss: Islet Cell Antibodies
and Lymphocyte Antibodies in the Spontaneously
diabetic BB Wistar Rat.
Diabetes 31: 278 - 281 (1982)
48. Dyrberg, T., P. Poussier, A. F. Nakhooda, E. B. Marliss,
A. Lernmark: Humoral Immunity in the Spontaneously
Diabetic BB Rat.
Metabolism 32 (1): 87 - 91 (1983)
49. Dyrberg, T., P. Poussier, A. F. Nakhooda, E. B. Marliss,
A. Lernmark: Islet Cell Surface and Lymphocyte
Antibodies Often Precede the Spontaneous Diabetes
in the BB Rat.
Diabetologia 26: 159 (1984)
50. Eisenbarth, G. S., M. A. Morris, R. M. Searce: Cytotoxic
Antibodies to Cloned Rat Islet Cells in Serum of
Patients with Diabetes Mellitus.
J. clin. Invest. 67: 403 - 408 (1981)
51. Eisenbarth, G. S., H. Oie, A. Gazdar, W. Chick, J. A.
Schulz, R. M. Searce: Production of Monoclonal Anti-
bodies Reacting with Rat Islet Cell Membrane Antigens.
Diabetes 30: 226 - 230 (1981)
52. Finke, E. A., P. E. Lacy, J. Ono: Use of Reflected Green
Light for Specific Identification of Islets in
Vitro After Collagenase Isolation.
Diabetes 28: 612 - 613 (1979)
53. Franklin, B., S. Rodriguez de Cordoba, M. Merritt,
R. Rubin, P. Rubinstein: ELISA Method for Islet-
Cell-Binding Antibody.
Diabetes 34: 66A (1985)

54. Gepts, W.: The Pathology of the Pancreas in Human Diabetes.
In D. Andreani, U. Di Mario, K. F. Federlin, L. G. Heding: Immunology in Diabetes. Kimpton Medical Publications, London 1984, 21 - 34
55. Gerner, R., J. L'Age-Stehr, T. O. Tjioe, A. Wacker:
Zur Isolierung Lagerhansscher Inseln aus Rattenpankreas.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 351: 309 - 312 (1970)
56. Ginsberg-Fellner, F., M. E. Witt, S. Yagihashi, M. J. Dobersen, F. Taub, B. Fedun, R. C. McEvoy, S. H. Roman, F. F. Davis, L. Z. Cooper, P. Rubinstein, A. L. Notkins: Congenital Rubella Syndrome as a Model for Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus: Increased Prevalence of ICSSA. Diabetologia 27: 87 -89 (1984)
57. Gleichmann, H., B. Zörcher, B. Greulich, F. A. Gries, H. R. Henrichs, J. Bertrams, H. Kolb: Correlation of Islet Cell Antibodies and HLA-DR-Phenotypes with Diabetes Mellitus in Adults. Diabetologia 27: 90 - 92 (1984)
59. Gordon, D. A., G. H. MacKenzie, L. H. Toledo-Pereyra: Efficient Pancreatic Islet Cell Preparation Utilizing a New Tissue Chopper Prior to Transplantation. Diabetologia 20: 79 - 80 (1981)
60. Gorsuch, A. N., K. M. Spencer, J. Lister, J. M. McNally, B. M. Dean, G. F. Bottazzo, A. G. Cudworth: Evidence for a Long Prediabetic Period in Type I Diab. Mell. Lancet II: 1363 (1981)

61. Gunnarson, R., G. F. Bottazzo, Z. R. Freedman, A. Lernmark, H. Zühlke, C. G. Groth: Does Specific Immunity to Islet-Cell Tissue Develop in Diabetics Receiving Pancreatic Grafts.
Horm. metab. Res. 12 (Supl.): 108 - 110 (1982)
62. Hahn, H. J., H. G. Lippmann, D. Schultz: Verhalten der Langerhans'schen Inseln des Pankreas in vitro.
Acta biol. med. germ. 25: 421 - 431 (1970)
63. Hebel, R., M. W. Stromberg: Anatomy of the Laboratory Rat. The Williams & Wilkins Company, Baltimore 1976.
64. Hedekov, C. J.: Mechanism of Glucose-Induced Insulin Secretion.
Physiol. Rev. 60(2): 442 - 509 (1980)
65. Hehmke, B., K. D. Kohnert, H. Dietz, H. Zühlke: Cytotoxic Effects of ICSSA.
Acta biol. med. germ. 41: 1117 - 1122 (1982)
66. Helmke, K., A. Otten, W. Willems: Islet Cell Antibodies in Children with Mumps Infection.
Lancet II: 211 (1980)
67. Helmke, K., H. Otten, W. R. Willems, R. Brockhaus, G. Müller-Eckhardt, T. Stief, J. Bertrams, H. Wolf, K. Federlin: Islet Cell Antibodies and the Development of Diabetes Mellitus in Relation to Mumps Infection and Mumps Vaccination.
Diabetologia 29: 30 - 33 (1986)
68. Herold, K. C., A. Huen, L. Gould, H. Traisman, A. H. Rubenstein: Alterations in Lymphocyte Subpopulations in Type I Diabetes Mellitus: Exploration of Possible Mechanisms and Relationships to Autoimmune Phenomena.
Diabetologia 27: 102 - 105 (1984)

69. Herold, K. C., A. Huen, A. Rubenstein, Å. Lernmark:
Humoral Abnormalities in Type I (Insulin-Dep.) Diabetes
Mellitus.
in D. Adreani, U. Di Mario, K. F. Federlin, L. G.
Heding: Immunology in Diabetes, Kimpton Medical
Publications, London 1984, 105 - 120.
70. Heydermann, E.: Immunoperoxidase Technique in Histopa-
thology: Applications, Methods and Control.
J. clin. Path. 32: 971 - 978 (1979)
71. Hoskins, P. J., C. Johnston, G. F. Bottazzo, R. D.
G. Leslie, P. A. Pyke: Islet Cell Antibodies: A
Non Specific Marker for the Development of Insulin-
Dependent Diabetes.
Diabetologia 27: 289A (1984)
72. Howard, C. F., T.-Y. Fang: Islet Cell Cytoplasmatic
Antibodies in *Macaca nigra*.
Diabetes 33: 219 - 223 (1984)
73. Howell, S. L., K. W. Taylor: Potassium Ions and the
Secretion of Insulin by Islets of Langerhans incu-
bated in vitro.
Biochemical Journal 108: 17 - 24 (1968)
74. Huen, A., M. Haneda, Z. Freedman, Å. Lernmark, A. H.
Rubenstein: Quantitative Determination of Islet
Cell Surface Antibodies Using ^{125}J -Protein A.
Diabetes 32: 460 - 465 (1983)
75. Ilonen, J., H. M. Surcel, A. Mustonen, M. C. Käär,
H. K. Akerblom: Lymphocyte Subpopulations at the
Onset of Type I Diabetes.
Diabetologia 27: 106 - 108 (1984)

76. Irvine, W. J., C. J. McCallum, R. S. Gray, C. J. Campbell, L. J. P. Duncan, J. W. Farquar, H. Vaughan, P. J. Morris: Pancreatic Islet-Cell Antibodies in Diabetes Mellitus Correlated with the Duration and Type of Diabetes, Coexistent Autoimmune Disease and HLA-Type. *Diabetes* 26: 138 (1977)
77. Itoh, M., M. Funanchi, U. Sato, S. Kisamori, N. Fukuma, Y. Hirooka, N. Niehei: Abnormal Lymphocyte Function Precedes Hyperglycemia in Mice Treated with Multiple Low Doses of Streptozotocin. *Diabetologia* 27: 109 - 112 (1984)
78. Jahr, H., S. Marx, W. Besch, K. P. Ratzmann: Correlations Between the Presence of Islet Cell Surface Antibodies in Human Serum and the Cytotoxic Effects on Rat Islet Beta Cells. *Acta biol. med. germ.* 41: 1099 - 1103 (1982)
79. Kajiyama, S., Y. Nakamura, N. Nakamura: An Improved Method for the Mass Isolation of Dog Pancreatic Islets. *Diabetes* 33 (1): 178A (1984)
80. Kanatsuna, T., Z. R. Freedman, A. R. Rubenstein, A. Lernmark: Effect of Islet Cell Surface Antibodies and Complement on the Release of Insulin and Chromium from Perifused Beta-Cells. *Clin. exp. Immunol.* 47: 85 (1982)
81. Kanatsuna, T., A. Lernmark, A. R. Rubenstein, D. F. Steiner: Block in Insulin Release from Column-Perifused Pancreatic Beta Cells Induced by Islet Cell Surface Antibodies and Complement. *Diabetes* 30: 231 - 234 (1981)
82. Karam, J. H., P. A. Lewitt, P. R. Prosser, H. Fujiya: Insulinopenic Diabetes After Rodenticide Ingestion. *Diabetes* 28 (Suppl.): 397 (1979)

83. Kataoka, S., J. Satoh, H. Fujiya, R. Suzuki, K. Itoh, K. Kumagai: Immunologic Aspects of the Nonobese Diabetic Mouse.
Diabetes 32: 247 - 253 (1983)
84. Kikuchi, M., A. Rabinovitch, W. G. Blackard, A. E. Renold: Perifusion of Pancreas Fragments: A System for the Study of Dynamic Aspects of Insulin Secretion.
Diabetes 23: 550 - 559 (1974)
85. Kim, Y. T., C. Steinberg: Immunologic Studies of the Induction of Diabetes in Experimental Animals: Cellular Basis for the Induction of Diabetes by Streptozotocin.
Diabetes 33: 771 - 777 (1984)
86. Kitagawa, Y., T. Kanatsuna, S. Kajiyama, Y. Kano, Y. Araki, M. Kondo: Preferential Interference with Glucose-Induced Insulin Release by Immunoglobulin from ICSA Positive Insulin-Dependent Diabetic Children.
Diabetes 34 (Suppl.): 85A (1985)
87. Kitagawa, Y., T. Kanatsuna, H. Mori, S. Kajiyama, M. Kondo: Comparison of the Properties of ICSA between Insulin-Dependent Diabetic Children and Polyglandular Failure.
Diabetes 33 (1): 159A (1984)
88. Kohnert, K. D., B. Ziegler, H. Dietz, H. Hahn v. Dorsche, M. Ziegler, H. Reiher: Formation of Islet Cell Monolayers from Fetal Human and Neonatal Rat Pancreatic Islets: Protein Biosynthesis, Insulin Synthesis and Binding of Islet Cell Antibodies.
Acta biol. med. germ. 41: 1163 - 1170 (1982)
89. Koivisto, J. A., A. Aro, K. Cantell, M. Haataja, J. Huttunen, S. L. Karonen, P. Mustajoki, R. Pelkonen, P. Seppälä: Remissions in Newly Diagnosed Type I Diabetes: Influence of Interferon as an Adjunct to Insulin Therapy.
Diabetologia 27: 193 - 197 (1984)

90. Kolb, H., G. Krügener, F. A. Gries, O. Bellmann: Islet Cell Antibodies: which method?
Lancet I: 479 (1983)
91. Kratzsch, G., S. Meyer, U. Hedderich: Detection of Islet Cell Antibodies by Indirect Immunofluorescence Using Pancreatic Section of Different Species: Diversity of Antigens and Antibodies.
Diabetologia 27: 299A (1984)
92. Krell, B. S. Rabin: Comparison of an Immunohistochemical and Immunofluorescence Procedure to Detect AB to Pancreatic Islet Cells.
Diabetes 33: 709 - 711 (1984)
93. Lacy, P., E. Finke, H. Gebel, D. Scharp: A Method for the Mass Isolation of Islets from the Canine Pancreas.
Diabetologia 25: 174 (1983)
94. Lacy, P. E., M. Kostianovsky: Method for the Isolation of Intact Islets of Langerhans from the Rat Pancreas.
Diabetes 16: 35 - 39 (1967)
95. Lacy, P. E., E. T. Lacy, E. H. Finke, Y. Yasunami: An Improved Method for the Isolation of Islets from the Beef Pancreas.
Diabetes 31 (4): 109 - 111 (1982)
96. Lacy, P. E., M. M. Walker, C. J. Fink: Perifusion of Isolated Rat Islets in Vitro: Participation of the Microtubular System in the Biphasic Release of Insulin.
Diabetes 21: 987 - 998 (1972)
97. Landgraf, R.: Untersuchungen über Kinetik und Steuerungsmechanismen der Insulinsekretion.
Habilitationsschrift, München 1974.
98. Langone, J. J.: ¹²⁵I-Protein A: A Tracer for General Use in Immunoassay.
J. immunol. Meth. 24: 269 - 285 (1978)

99. Langone, J. J.: Protein A of *Staphylococcus aureus* and Related Immunoglobulin Receptors Produced by *Streptococci* and *Pneumococci*.
Adv. Immunol. 32: 158 - 252 (1982)
100. Langone, J. J.: Use of Labeled Protein A in Quantitative Immunochemical Analysis of Antigens and Antibodies.
J. immunol. Meth. 51: 322 (1982)
101. Langone, J. J., M. D. P. Boyle, T. Borsos: ¹²⁵I-Protein A: Application to the Quantitative Determination of Fluid Phase and Cell bound IgG.
J. immunol. Meth. 18: 281 -293 (1977)
102. Leiter, E. H., D. Simon, M. Cherry, C. A. Phillips: Induction in C57BL/KsJ Mice of Complement-Dependent Antibody Cytotoxic to Cultured Beta Cells.
Diabetes 30: 30 - 39 (1981)
103. Lendrum, R., G. Walker, D. R. Gamble: Islet-Cell Antibodies in Juvenile Diabetes Mellitus of Recent Onset.
Lancet I: 880 (1975)
104. Lernmark, Å.: The Preparation of, and Studies on, Free Cell Suspensions from Mouse Pancreatic Islets.
Diabetologia 10: 431 - 438 (1974)
105. Lernmark, Å.: Cell Mediated Immunity in (Insulin-Dependent) Diabetes: Update 84.
In D. Adreani, U. Di Mario, K. F. Federlin, L. G. Heding: *Immunology in Diabetes*. Kimpton Medical Publications, London 1984, 121 - 132
106. Lernmark, Å.: Molecular Biology of Type I (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus.
Diabetologia 28: 195 - 203 (1985)

107. Lernmark, Å., S. Baekkeskov: Islet Cell Antibodies - Theoretical and Practical Implications.
Diabetologia 21: 431 (1981)
108. Lernmark, Å., T. Dyrberg, J. H. Nielsen: Preparation of Islet Cell Suspensions.
In J. Larner, S. L. Pohl: Methods in Diabetes Research
1C. Harper, London 1984, 260 - 265
109. Lernmark, Å., Z. R. Freedman, C. Hofmann, A. H. Rubenstein, D. F. Steiner, R. L. Jackson, R. J. Winter, H. S. Traisman: Islet-Cell-Surface Antibodies in Juvenile Diabetes Mellitus.
New Eng. J. Med. 299: 375 - 380 (1978)
110. Lernmark, Å., B. Hägglöf, B. Freedman, Z. R. Irvine, W. J. Ludvigsson, G. Holmgren: A Prospective Analysis of Antibodies Reactive with Pancreatic Islet Cells in IDMM Children.
Diabetologia 20: 471 (1981)
111. Lernmark, Å., T. Kanatsuna, C. Patzelt, K. Diakoumis, R. Carroll, A. H. Rubenstein, D. F. Steiner: Antibodies Directed Against the Pancreatic Islet Cell Plasma Membrane.
Diabetologia 19: 445 - 451 (1980)
112. Levy-Marchal, C., M. C. Quinon, M. Debray-Sachs, P. Csernichow: Longitudinal Study of Cytotoxic Antibodies and Inhibitory Lymphocytes in Seven Diabetic Children During the First Year of their Disease.
Diabetologia 27: 303A (1984)
113. Loubatières, A. L., M. M. Loubatières-Mariani, R. Alric, G. Ribes, H. Agot: Studies of the Action of Neutral Red on Glycemia and on Insulin and Glucagon Secretion in the Dog.
Horm. metab. Res. 6: 111 - 115 (1974)

114. Lowry, D. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall:
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. biol. Chem. 193: 265 - 275 (1951)
115. MacCuish, A. C., J. Jordan, C. J. Campbell, L. J. Duncan,
W. J. Irvine: Antibodies to Islet Cells in Insulin
Dependent Diabetes with Coexistent Autoimmune Disease.
Lancet II: 1529 - 1533 (1974)
116. MacDonald, M. J.: Inexpensive Modification of a Polytron
for Rapid Mincing of Pancreases for Islet Isolation.
Analyt. Biochem. 108: 419 - 421 (1980)
117. MacLaren, N. K., S.-W. Huang, J. Fogh: Antibody to Cultured
Human Insulinoma Cells in Insulin-Dependent Diabetes.
Lancet I: 997 - 1000 (1975)
118. MacKay, P., A. Boulton, A. Rabinovitch: Lymphoid Cells
of BB/W Diabetic Rats Are Cytotoxic to Islet Beta
Cells in vitro.
Diabetes 34: 706 - 709 (1985)
119. McEvoy, R., J. Andersson, S. Sandler, C. Hellerström:
Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Diabetes
in the Mouse: Evidence for Stimulation of a Cytotoxic
Cellular Immune Response Against an Insulin-Producing
Beta-Cell-Line.
J. clin. Invest. 74: 715 - 722 (1984)
120. Madsen, O. D., M. Landin Olsson, G. Bille, G. Sundkvist,
Å. Lernmark, G. Dahlquist, J. Ludvigsson: A Two-Colour
Immunofluorescence Test with a Monoclonal Human
Proinsulin Antibody Improves the Assay for Islet
Cell Antibodies.
Diabetologia 29: 115 - 118 (1986)

121. Mandrup-Poulsen, T., C. R. Stiller, G. Bille, R. Martell, P. A. Keown, N. W. Rodger, B. V. Graffenried, J. Nerup, B. Marner, D. Heinrichs, J. Dupre, M. R. Jenner, B. Wolfe, C. Binder: Disappearance and Reappearance of Islet Cell Cytoplasmatic Antibodies in Cyclosporin-Treated Insulin-Dependent Diabetics.
Lancet: 559 - 602 (1985)
122. Marner, B., T. Agner, C. Binder, T. Mandrup-Poulsen, J. Nerup, S. Waldorf: Islet Cell Antibodies Predict Loss of Fasting C-Peptide.
Diabetologia 27: 307A (1984)
123. Marner, B., A. Lernmark, J. Nerup, J. L. Molenaar, C. W. Tuk, G. J. Bruining: Analysis of Islet Cell Antibodies on Frozen Sections of Human Pancreas.
Diabetologia 25: 93 - 96 (1983)
124. Marschner, I., R. Herndl, P. C. Scriba: Comparison of Four Different Algorithms for the Calculation of Radioimmunoassay Standard Curves.
J. clin. Chem. clin. Biochem. 18: 105 - 109 (1980)
125. Martin, D. R., J. Logothetopoulos: Complement-Fixing Islet Cell Antibodies in the Spontaneously Diabetic BB Rat.
Diabetes 33: 93 - 96 (1984)
126. Maruyama, T., J. Takei, J. Matsuba, A. Tsuruoka, M. Taniyama, Y. Ikeda, K. Kataoka, M. Abe, S. Matsuki: Cell-Mediated Cytotoxic Islet Cell Surface Antibodies to Human Pancreatic Beta Cells.
Diabetologia 26: 30 - 33 (1984)
127. Maruyama, T., I. Takei, M. Taniyama, K. Kataoka, S. Matsuki: Immunological Aspects of Nonobese Diabetic Mice: Immune Islet-Cell Killing Mechanism and Cell-Mediated Immunity.
Diabetologia 27: 121 - 123 (1984)

128. Matsuba, J., Y. Ikeda, T. Tanese, M. Abe, H. Ishikawa:
Establishment of Human Pancreatic Islet Clones
Secreting Insulin and Glucagon.
Diabetologia 23: 186 (1982)
129. Matsuba, J., T. Tanese, Y. Ikeda, M. Abe, B. Marner,
A. Lernmark: Islet Cell Cytoplasmatic and Cell
Surface Antibodies React with a Human Pancreatic
Beta Cell Clone.
Diabetologia 27: 308A (1984)
130. Michaelis, D., B. Helmke, J. Rjasanowski, W. Hildmann,
H. Keilacker, K. O. Kohnert, P. Heinke: Association
between ICA, CAMC, HLA and Residual Beta Cell
Function in Newly Diagnosed Diabetes.
Diabetologia 27: 310A (1984)
131. Michaelis, D., J. Rjasanowski, K. P. Ratzmann, J. Strese,
H. Dietz, W. Hildmann: Is There a Relationship Between
ICSA and Clinical Biochemical Hormonal and Immunogenetic
Parameters in Newly Diagnosed Type I Diabetes?
Acta biol. med. germ. 41: 1093 - 1098 (1982)
132. Mori, Y., J. Matsuba, T. Tanese, Y. Ikeda, M. Abe:
Cellular Hypersensitivity to Human Pancreatic Beta-Cell
Clone in Diabetes Mellitus and its Relationship
to the Presence of Islet Cell Antibodies.
Diabetologia 27: 313A (1984)
133. Moskalewski, S.: Isolation and Culture of the Islets
of Langerhans of the Guinea Pig.
Gen. comp. Endocr.: 342 - 353 (1965)
134. Mustonen, A., M. Knip, H. K. Akerblom: An Association
Between Complement-Fixing Cytoplasmatic Islet Cell
Antibodies and Endogeneous Insulin Secretion in
Children with IDDM.
Diabetes 32: 743 - 747 (1983)

135. Mustonen, A., M. Knip, N. P. Huttunen, R. Puukka, M. L. Käär, H. K. Akerblom: Evidence of Delayed Beta-Cell-Destruction in Type I (Insulin-Dependent) Diabetic Patients with Persisting Complement Fixing Cytoplasmatic Islet Cell Antibodies.
Diabetologia 27: 421 - 426 (1984)
136. Nakamura, M., S. Nagafuchi, T. Okeda, E. Kohnoue, S. Nakano, T. Koga, M. Nakayama, Y. Niho, R. Takaki: The In Vivo Role of Experimentally Produced Anti-Islet-Cell-Surface-Antibodies (ICSA) in the Development of Diabetes Mellitus.
Diabetes 34 (Suppl.): 180A (1985)
137. Nayak, R. C., M. A. K. Omar, A. Rabizadeh, S. Srikanta, G. S. Eisenbarth: "Cytoplasmatic" Islet Cell Antibodies. Evidence That the Target Antigen Is a Sialoglycoconjugate.
Diabetes 34: 617 - 619 (1985)
138. Offord, R. E., P. A. Halban: Isolation of Pancreatic Islets of Langerhans by Filtration on Nylon Mesh.
Biochem. biophys. Res. Commun. 82: 1091 - 1097 (1978)
139. Ono, J., R. Takaki, M. Fukuma: Preparation of Single Islet Cells from Pancreatic Islets of Adult Rats by the Use of Dispase.
Endocr. jap. 24: 265 - 270 (1977)
140. Panten, U., H. Ishida, P. Schauder, H. Frerichs, A. Hasselblatt: A Versatile Microperifusion System.
Analyt. Biochem. 82: 317 - 326 (1977)
141. Peterson, G. L.: A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable.
Analyt. Biochem. 83: 346 - 356 (1977)

142. Peterson, G. L.: Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Roseborough, Farr and Randall.
Analyt. Biochem. 100: 201 - 220 (1979)
143. Petersson, B., C. Hellerström, R. Gunnarson, R. Andersson:
A Method for Enzymatic Dissociation of Cells from Isolated Pancreatic Islets.
Acta diabet. lat. 10: 725 - 736 (1973)
144. Pipeleers, D. G.: Islet Cell Purification.
In J. Larner, S. L. Pohl: Methods in Diabetes Research
1B. Harper, London 1984, 186 - 211
145. Pipeleers, D. G., P. A. In't Veld, M. van de Winkel, E. Maes, F. C. Schuit, W. Gepts: A New In Vitro Model for the Study of Pancreatic A and B Cells.
Endocrinology 117: 806 - 816 (1985)
146. Pipeleers, D. G., M. A. Pipeleers-Marichal: A Method for the Purification of Single A, B and C Cells and for the Isolation of Coupled Cells from Isolated Rat Islets.
Diabetologia 20: 654 - 663 (1981)
147. Pollard, D. R., K. Gupta, L. Mancino, I. Hymie: An Immunofluorescence Study of Anti-Pancreatic Islet Cell Antibodies in the Spontaneously Diabetic BB Wistar Rat.
Diabetologia 25: 56 - 59 (1983)
148. Poussier, P., C. H. Brogren, F. Hirsch, P. Druet: Monoclonal Antibody from the BB Rat against Rat Insulin-Producing Cells.
Diabetes 33 (1): 158A (1984)

149. Prud'homme, G. J., A. Fuks, E. Colle, R. D. Guttman:
Isolation of T-Lymphocyte Lines with Specificity
for Islet Cell Antigens from Spontaneously Diabetic
(Insulin-Dependent) Rats.
Diabetes 33: 801 - 803 (1984)
150. Pujol-Borell, R., E. L. Khoury, G. F. Bottazzo:
Islet cell Surface Antibodies in Type I (Insulin-
Dependent) Diabetes Mellitus: Use of Human Fetal
Pancreas Cultures as Substrate.
Diabetologia 22: 89 (1982)
151. Quiniou-Debrie, M. C., M. Debrays-Sachs, M. Dardenne,
P. Czernichow, J. F. Bach: Anti Islet Cellular
and Humoral Immunity, T-Cell Subsets, and Thymic
Function in Type I Diabetes.
Diabetes 34: 373 - 379 (1985)
152. Rabinovitch, A., P. MacKay, J. Ludvigson, A. Lernmark:
A Prospective Analysis of Islet-cell Cytotoxic
Antibodies in Insulin-Dependent Diabetic Children.
Transient Effects of Plasmapheresis.
Diabetes 33: 224 - 228 (1984)
153. Rabinovitch, A., T. Russell, F. Shienvold, J. Noel,
N. Files, Y. Patel, M. Ingram: Preparation of
Rat Islet B-Cell-Enriched Fractions by Light-Scatter
Flow Cytometry.
Diabetes 31: 939 - 943 (1982)
154. Rabinowe, S. L., G. S. Eisenbarth: Immunotherapy of
Type I (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus.
In D. Andreani, U. Di Mario, K. F. Federlin, L. G.
Heding: Immunology in Diabetes. Kimpton Medical
Publications, London 1984, 171 - 176
155. Raydt, G.: Isolation of Functionally Intact Pancreatic
Islets by Centrifugation in Metrizamide Gradients.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 358: 1369 - 1373
(1977)

156. Riley, W. J., R. Spillar, J. Waltz, B. Brody:
Predictive Value of Islet Cell Autoantibodies (ICA)-
6 Years Experience.
Diabetes 33 (1): 44A (1984)
157. Rimoin, D. C., J. I. Rotter: The Genetics of Diabetes
Mellitus.
In D. Andreani, U. Di Mario, K. F. Federlin, L.
G. Heding: Immunology in Diabetes. Kimpton Medical
Publications, London 1984, 45 - 62
158. Rittenhouse, H. G., D. L. Oxender, S. Pek, D. Ar:
Complement-Mediated Cytotoxic Effects on Pancreatic
Islets with Sera from Diabetic Patients.
Diabetes 29: 317 - 322 (1980)
159. Rosenbloom, A. L.: Autoantibodies to Islet Cells:
Comparison of Methods.
Lancet I: 72 - 73 (1983)
160. Roth, J.: Preparation of Protein-A-Silver and Protein-
A-Gold Complexes and Their Application for Localization
of Single and Multiple Antigens in Paraffin Sections.
J. Histochem. Cytochem. 30: 691 - 696 (1982)
161. Rousset, B., B. Vialettes, F. Bernier-Valentin, P. Vague,
M. Beylot, R. Mornex: Anti-Tubulin Antibodies in
Recent Onset Type I (Insulin-Dependent) Diabetes
Mellitus: Comparison with Islet Cell Antibodies.
Diabetologia 27: 427 - 432 (1984)
162. Sai, P., M. Kremer, M. Nomballais: Visualisation of
Islet-Cell Antibodies in the Islet from Type I
Diabetics.
Diabetes 33 (1): 62A (1984)
163. Sai, P., C. Boitard, M. Debray-Sachs, A. Pouplard,
R. Assan, J. Hamburger: Complement-Fixing Islet-
Cell Antibodies from Some Diabetic Patients Alter
Insulin Release in Vitro.
Diabetes 30: 1051 (1981)

164. Scharp, D. W., R. Downing, R. C. Merell, M. Greider:
Isolating the Elusive Islet.
Diabetes 29 (1): 19 - 30 (1980)
165. Scharp, D. W., R. Downing, R. C. Merell, S. Nunnally,
D. Kiske, M. H. Greider: New approaches in the
Methods for Isolating Mammalian Islets of Langerhans
Utilizing the Dog Pancreas.
Horm. metab. Res. 12 (Suppl.): 9 - 28 (1982)
166. Scharp, D. W., C. B. Kemp, M. J. Knight, W. F. Ballinger,
P. E. Lacy: The Use of Ficoll in the Preparation
of Viable Islets of Langerhans from the Rat Pancreas.
Transplantation 16: 685 - 689 (1973)
167. Secchi, A., E. Bosi, J. Traeger, J. M. Dubernard, A. Gelet,
P. M. Piatti, A. E. Pontiroli, G. F. Bottazzo:
Islet Cell Antibodies in Type 1 Diabetic Patients
After Pancreatic Transplantation.
Abstract: 4th Workshop of The Study Group of the EASD,
Igls, Austria Feb. 3 - 5, 1985: 77
168. Shibata, A., C. W. Ludwigsen, S. P. Naber, M. L. McDaniel,
P. E. Lacy: Standardisation of a Digestion-Filtration
method for Isolation of Pancreatic Islets.
Diabetes 25: 667 - 672 (1976)
169. Soderstrum, W. M. K., Z. Freedman, A. Lernmark:
Complement Dependent Cytotoxic Islet Cell Surface
Antibodies in Insulin Dependent Diabetes.
Diabetes 28 (Suppl.): 397 (1979)
170. Spencer, K. M., B. M. Dean, A. Tarn, J. Lister, G.
F. Bottazzo: Fluctuating Islet-Cell Autoimmunity
in Unaffected Relatives of Patients with Insulin-
Dependent Diabetes.
Lancet I: 764 - 766 (1984)

171. Srikanta, S., A. Rabizadeh, M. A. K. Omar, G. S. Eisenbarth:
Assay for Islet Cell Antibodies: Protein A-Monoclonal
Antibody Method.
Diabetes 34: 300 - 305 (1985)
172. Stiller, C. R., G. Dupré, M. Gent, M. R. Jenner, P. A.
Keown, A. Laupacis, R. Martell, N. W. Rodger, B. v.
Graffenried, B. J. J. Wolf: Effects of Cyclosporin A
Immunosuppression in Insulin-Dependent Diabetes
Mellitus of Recent Onset.
Science 223: 1362 - 1367 (1984)
173. Stiller, C. R., J. Dupré, M. Gent, M. Jenner, P. A.
Keown, A. Lampacis, R. Martell, R. Mazahari, N.
W. Rodger, B. v. Graffenried, B. M. Wolfe, C. Binder,
J. Nerup, A. Rabinovitch: Effects of Cyclosporine in
Type 1 Diabetes: Clinical Course and Immune Response.
Diabetes 33 (1): 13A (1984)
174. Suzuki, M., S. Kawazu, J. Ishii, Y. Shimamura, N. Kono:
An Application of Flowcytometry for the Measurement
of Islet Cell Surface Antibodies (ICSA) and Complement-
Dependent Antibody-Mediated Cytotoxicity (CAMC).
Diabetes 33 (1): 63A (1984)
175. Taub, F., J. Scharff: Assay of Islet Cell Antibodies, a
More Sensitive Method.
Diabetes 33 (1): 63A (1984)
176. Toguchi, Y., F. Ginsberg-Fellner, P. Rubinstein: Islet-
Cell Surface Antibodies in Patients with Insulin
Dependent Diabetes and First Degree Relatives:
A Study of 112 Families.
Diabetes 32 (1): 151A (1983)
178. Toniolo, A., T. Onodera: Viruses and Diabetes.
In D. Andreani, U. Di Mario, K. F. Federlin, L. G.
Heding: Immunology in Diabetes. Kimpton Medical
Publications, London 1984, 21 - 34

179. Tze, W. J., F. Wong, A. J. Tingle: The Use of Hypaque-Ficoll in the Isolation of Pancreatic Islets in Rats.
Transplantation 22: 201 - 205 (1976)
180. Van de Winkel, M., G. Smets, W. Gepts, D. Pipeleers: Islet Cell Surface Antibodies from Insulin-Dependent Diabetics Bind Specifically to Pancreatic B Cells.
J. clin. Invest. 70: 41 (1982)
181. Vialettes, B., C. Di Campo-Rougerie, V. Lassmann, Ph. Vague: Comparaison de divers types d'anticorps anti-ilots dans le diabète en fonction de la cause et de la durée d'évolution.
La Presse Médicale 12: 2303 - 2306 (1983)
182. Welsh, K. I., G. Dorval, H. Wigzell: Rapid Quantitation of Membrane Antigens.
Nature 254: 67 - 69 (1975)
183. Wigzell, H.: Quantitative Titrations of Mouse H-2 Antibodies Using ⁵¹Cr-Labelled Target Cells.
Transplantation 3: 423 - 431 (1965)
184. Witte, A.: Der Einfluß von Polypeptidhormonen auf die Insulinsekretion. Untersuchung an perfundierten Ratteninseln.
Dissertation, München, Ludwig-Maximilians-Universität, (1977).
185. Yagihashi, S., H. Suzuki, M. J. Dobersen, A. L. Notkins, F. Ginsberg-Fellner: Autoantibodies to Islet Cells: Comparison of Methods.
Lancet II: 1218 (1982)
186. Yamaguchi, Y., S. Miyake, K. Toyama, Y. Ikeda, N. Kuriya, Y. Ueda, A. Takahashi, S. Nagataki: Production in Vitro of ICA in Insulin-Dependent Diabetes.
Diabetologia 27: 347A (1984)

187. Yokono, K., K. Shii, J. Hari, S. Yaso, Y. Imamura, K. Ejiri, K. Ishibara, S. Fujii, T. Kazumi, H. Taniguchi, S. Baba: Production of Monoclonal Antibodies to Islet Cell Surface Antigens Using Hybridization of Spleen Lymphocytes from Non-Obese Diabetic Mice. *Diabetologia* 26: 379 - 385 (1984)
188. Zekorn, T., R. Bretzel, K. Federlin: Cytotoxic and Islet Cell Surface Antibodies after Allogenic Islet Transplantation in Rats.
Abstract: 4th Workshop of the Study Group of the EASD, Igls, Austria Feb. 3 - 5, 1985: 90
189. Ziegler, M., A. Lernmark, H. Dietz, K. D. Kohnert: Influence of Serum IgG on Insulin Release of Perfused Isolated Islets in Newly Diagnosed Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetic Patients. *Diabetologia* 23: 211 (1982)

L e b e n s l a u f

Am 14.12.1957 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Karl Heinz Heim und seiner Ehefrau Ellen, geb. Rüter, in Nordhorn geboren.

Von 1964 bis 1967 besuchte ich die Grundschule in Marbach am Neckar. Anschließend trat ich in das Friedrich-Schiller-Gymnasium Marbach a. N. ein, an dem ich im Mai 1976 die Reifeprüfung ablegte.

Meinen Ersatzdienst leistete ich von Oktober 1976 bis Februar 1978 im Kreiskrankenhaus Freising ab.

Mit dem Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1978 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Hier bestand ich im März 1980 die ärztliche Vorprüfung, im März 1981 den ersten, im März 1983 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Mein praktisches Jahr absolvierte ich in der Medizinischen Klinik Innenstadt, in der Chirurgischen Klinik Innenstadt und im von Hauner'schen Kinderspital in München.

Am 6. November 1984 bestand ich den 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Am 23. Januar 1985 bestand ich das "Foreign Medical Graduate Examination in the Medical Sciences" (FMGEMS).

Von März 1982 bis Dezember 1985 arbeitete ich am experimentellen Teil der vorliegenden Promotionsarbeit. Seit Mai 1986 arbeite ich im Labor Dr. Gerzer in der Medizinischen Klinik Innenstadt über die Regulation der Guanylatcyclyase.

Herrn Prof. Dr. R. Landgraf danke ich für die Überlassung des Themas, für die wertvollen Anregungen, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und für die Korrektur.

Herrn Prof. Dr. E. Buchborn danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Frau Dr. Landgraf-Leurs danke ich für die anregende Kritik.

Frau Gabriele Brons, New Addenbrooks Hospital, University of Cambridge danke ich für die Einführung in die Inselisolation.

Herrn Dr. P. Arnold danke ich für die Anfertigung der histologischen Schnitte.

Ganz besonders danken möchte ich Frau Sigrid Kammerer für die tatkräftige und konstruktive Mithilfe.

Frau Beate Zimmermann danke ich für die Erstellung der Zeichnungen.

Frau Sabine Buck danke ich herzlich für die Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

